

# ゼブラフィッシュ胚の耳石形成における炭酸脱水酵素の関与

松本 寛子

東京薬科大学 博士学位論文

## 略語

CA : Carbonic anhydrase

LC<sub>50</sub> : 半数致死濃度

EC<sub>50</sub> : 半数影響濃度

TPO : 甲状腺ペルオキシダーゼ

EZA : エトキシゾルアミド

AZA : アセタゾルアミド

DZA : ドルゾルアミド

AR : アンドロゲン受容体

PTU : プロピルチオウレア

MMI : メルカプトメチルイミダゾール

dpf : days-post fertilization

hpf : hours-post fertilization

MO : Morpholino oligonucleotide

PBS : Phosphate buffered saline

PBST : Phosphate buffered saline containing 0.25% triton

## 目次

諸言 .....	4
第一章	
背景 .....	6
方法 .....	8
結果 .....	10
考察 .....	12
Table および Figure .....	14
第二章	
背景 .....	31
方法 .....	32
結果 .....	35
考察 .....	37
Table および Figure .....	38
第三章	
背景 .....	47
方法 .....	48
結果 .....	52
考察 .....	55
Table および Figure .....	57
引用文献 .....	66

## 諸言

近年、産業の発展に伴い環境に多くの化学物質が使用されており、そのうち人工的に作られた化学物質は世界全体で現在十万種以上とも言われている。多種多様な化学物質が人々の生活を支える反面、大半は環境やヒトへの安全性が全て明らかになっていないため世界的なリスク管理が進められている。

日本国内における化学物質のリスク管理は、生体内への残留性や長期毒性を有する物質の製造および使用に制限が設けられている。新規化学物質および一定の生産量を超える化学物質に対しては化学物質の生産量、環境中への排出量を把握、届け出が必要となるとともに、ヒトや環境生物へのリスク評価が義務付けられている。

農薬のように環境中で使用され、河川や湖沼へ流入し環境へのリスクが想定される化学物質は、環境生物への影響評価が必須とされている。その結果、生態系に影響を及ぼす可能性がある農薬は、使用量や使用回数の制限が講じられ生物への影響を与えないような規制がなされる (Hayasaka et al., 2013; Komoike et al., 2016)。

医薬品については、以前は規制対象外であったが、ヒトや動物に対して生理活性を有するよう創薬された化合物であり環境中に生息する生物に対しても同様の作用との懸念がもたれるため、リスク評価および規制が強化されてきている。欧州および米国では 2000 年頃より新規開発される医薬品について環境影響評価が義務付けられてきており、日本においても 2016 年 4 月より新たに開発される医薬品においては環境中でのリスク把握が求められることとなった。医薬品は、廃棄物やヒトの排泄物から一部は薬効を保ったまま下水道に流入し、下水処理で除去できなかった一部が環境へと移行する可能性がある。日本の河川においても複数の医薬品成分が検出されており (Komori et al., 2009)、生態系への毒性影響やヒトへの健康影響に関するリスクの把握、研究が進められている。

上記に示した化学物質の環境生物への影響評価は、国際的な試験評価基準である経済開発協力機構(OECD)テストガイドライン等に準じた評価が求められる。多数の生物から構成される生態系に対する化合物の影響評価には、先ず各生態的地位の代表種として一般的には生産者である緑藻、低次消費者であるミジンコ、高次消費者である魚類を用いた評価がなられ、各生物種の個体群レベルでの影響を及ぼす濃度と、環境中における化学物質の薬物動態から算出された予測環境中濃度を比較することで、生態系へのリスクが評価される。その結果、予測された環境中濃度にて生物への影響が想定された場合には、複数種ならびに詳細な影響評価(長期毒性試験、胚や稚魚に対する毒性試験、繁殖毒性試験、模擬生態系試験等)が求められ、毒性影響を精査する必要がある。高次の評価においても、環境影響が懸念される場合には、製造や使用中止、登録取り消し等の判断が下されることになる。

近年、魚類への毒性影響については、胚や稚魚等の発達成長過程に対する影響評価の重要性が提唱されている。その理由としては胚や稚魚は組織や臓器の未発達であるため免疫や解毒機能も十分ではなく、加えて表皮の防御機能が低いため体表からの化合物取り込み量が成魚に比べ高いため、化学物質によっては成魚に比べ胚や稚魚に対する感受性が高い可能性があるためである(Nagel, 2002; Russell et al., 1999; von Westernhagen, 1988, Braunbeck et al., 2005; Lammer et al., 2009; Seiler et al., 2014)。米国環境保護庁(EPA)では多様な化学物質の総体的に管理する手法の1つとして、主に農薬や一般化学物質のゼブラフィッシュ胚に対する化学物質の毒性評価が進められている。ゼブラフィッシュはゲノムの全塩基配列解析が完了し、全ての遺伝子構造が明らかとなっているため発生学や遺伝学研究においてもモデル生物として用いられている魚種である。また飼育や繁殖が容易、卵生生物であり胚が透明、胚発生が早く、世代交代も早い等の特徴を有することから受精卵や胚発生過程への化学物質等の影響評価に適している。

本研究ではゼブラフィッシュ胚に高感受性を示す化学物質を抽出することを目的として、胚発達期に重要と考えられる pH 維持やイオン産生など細胞や組織の恒常性を司るタンパク質や生長に関わるホルモンに着目し、それら機能をつかさどるタンパクやホルモン合成を阻害する化学物質の胚毒性を網羅的に解析した。

その結果、最も影響の強かった化合物である CA 阻害剤のエトキシゾルアミド(EZA)については、高い胚毒性の要因を解析することを目的として、内耳における耳石形成や遊泳への影響およびそれに関わる CA 発現や局在解析、胚への化合物蓄積と酵素活性阻害について検討した。さらに胚発達期の聴覚や平衡覚の異常を明らかにするため、耳石が司る聴覚や平衡覚の感覚受容器である *neuromast* を構成する有毛細胞の損傷を組織学的、形態学的に捉え解析しゼブラフィッシュ胚で生じた内耳毒性の作用性を明らかとすることを目的とした。

## 第一章 ゼブラフィッシュ胚発生過程に影響を及ぼす化学物質の影響比較

### 背景

細胞や組織、生体の恒常性維持は細胞分裂や細胞新生、組織形成が活発化する胚発達期において重要である。細胞や組織は発生初期からイオン輸送体や酵素等が発現し細胞内のイオン濃度や pH を制御することで恒常性が維持される。化学物質により制御機能が破たんすると正常な細胞分裂や分化を阻害され、重篤な場合には細胞死や奇形を引き起こされる (Scott et al., 1990)。一方で、生体としての恒常性維持は神経系と内分泌系により制御されている。神経系による生体制御は、脳および脊髄からなる中枢神経系と中枢神経から延びる末梢神経に大別され、ホルモンや神経伝達物質として働く神経ペプチドを合成・分泌し、内分泌系の調節など様々な生理作用の調節も行っている。内分泌系は甲状腺、副腎、すい臓、卵巣、精巣等の分泌細胞が集合した腺組織であり、内外からの刺激によりホルモンを合成し、標的臓器へ分泌する。成長過程では神経系および内分泌系の機能が活発化しているため、これら機能への化学物質の影響は、恒常性機能異常やかく乱作用を引き起こし分化や形態形成に影響を与えることが懸念される (van Gelder et al., 2010)。

そこで、上記に示した組織や生体の恒常性を司る酵素やホルモン等を阻害する化合物をゼブラフィッシュ胚に暴露し、胚発達過程での化学物質のリスク把握を行った。まず、恒常性維持に関わる酵素である炭酸脱水酵素(CA)を阻害する化合物を選択し評価対象とした。CA 阻害剤は、哺乳類の胎児に対し細胞内 pH 制御機能を破たんさせ骨形成異常や心臓奇形を誘発することが報告されている (Scott et al., 1990)。CA は魚類の初期胚においても多数の組織に局在し、器官や臓器形成や発達に大きく貢献する酵素である (Aspatwar, 2013; Lin et al., 2008; Liao et al., 2009; Ito et al., 2013)。

内分泌系に関わるホルモンとしては初期胚発生にて骨や脳形成に関わる雌性ホルモンであるエストロゲンに着目した。エストロゲンは雄性ホルモンであるアンドロゲンからアロマターゼという酵素を介して産生されることから、アロマターゼを阻害する化合物、アンドロゲンと受容体の結合を阻害する化合物、雄性ホルモン合成を阻害する化合物を供試した。

内分泌系の重要な組織の1つである甲状腺は、正常な胚形態形成および神経系発達に必須となるホルモンである甲状腺ホルモンを分泌する。甲状腺ホルモンは甲状腺ペルオキシダーゼ(TPO)という酵素により産生されるため、本酵素を阻害する薬剤をゼブラフィッシュ胚に暴露し胚発生への影響を評価した。

神経系の発達は、多数の神経細胞が増殖、分化することで形成され、発達期の神経細胞の損傷は脳や脊椎、口蓋等多くの組織に異常をきたすことが知られている。神経伝達物質であるドーパミンやセロトニンの受容体結合を阻害する抗うつ作用を示す化

合物は哺乳類の神経発達に影響を示し神経管閉鎖阻害作用を引き起こす報告(Nau et al., 1991)があることからそれら化合物をゼブラフィッシュ胚に暴露した。

上述に示した胚発達期に重要と考えられる pH 維持やイオン産生など細胞や組織の恒常性を司るタンパク質や生長に関わるホルモンに対する阻害剤への感受性差を調べることで高胚毒性を引き起こす化学物質の特徴を検索した。

## 方法

### 使用生物

(独)理化学研究所から分譲された 5~10 か月齢の雌雄のゼブラフィッシュ(RIKEN WT, *Danio rerio*) を用いた。

### 飼育条件

飼育には流水式水槽(名東水園)を用い、水温 28.5 °C、光条件(明 14 時間、暗 10 時間)に雌雄別に飼育し、1 日 4 回粉末飼料、うち 2 回は雌のみブラインシュリンプも給餌した。

### 受精卵採取

受精卵を採取する前日夕方に雌雄のゼブラフィッシュを交配させ、翌朝受精卵を得た。得られた受精卵はシャーレに移し 10%クロラミン T 含有 0.3×Danieau's solution [17.4 mM NaCl, 0.21 mM KCl, 0.12 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.18 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 1.5 mM HEPES pH 7.2; Gustafson et al., 2012]にて消毒した後、0.3×Danieau's solution で 3 回洗浄した。洗浄後 28°C で受精後 6 時間までインキュベートした。

### 化合物暴露

受精 6 時間後に実体顕微鏡下で正常発生している胚を 24well plate に移し (1 embryo/well)、DMSO に溶解した化合物を添加した。DMSO 濃度は 0.1%(v/v)となるよう添加した。対照群には 0.1%(v/v)となるよう DMSO を添加し、いずれも 5 日間 28°C でインキュベートした。

### 胚の形態観察

受精後 5 日に実体顕微鏡(M125, Leica)下で胚の生死、形態観察、遊泳行動の観察を行った。形態観察は、体節、頭部、尾部、脊索、耳部、眼、心臓、卵黄囊、血液循環に着目して観察した。



## 評価化合物

下記表の化合物を評価した。

化合物名	作用	製造元
エトキシゾルアミド (EZA)	CA 阻害	シグマアルドリ ッチ
アセタゾルアミド(AZA)	CA 阻害	シグマアルドリ ッチ
ドルゾルアミド(DZA)	CA 阻害	東京化成
アナストロゾール	アロマターゼ阻害	東京化成
レトロゾール	アロマターゼ阻害	東京化成
フルタミド	アンドロゲン受容体(AR)阻害	シグマアルドリ ッチ
フィナステリド	5 $\alpha$ レダクターゼ阻害	LKT Laboratories
プロピルチオウレア (PTU)	TPO 阻害剤	シグマアルドリ ッチ
メルカプトメチルイミ ダゾール(MMI)	TPO 阻害剤	シグマアルドリ ッチ
エチレンチオウレア	TPO 阻害剤	東京化成
ロキサピン	ドーパミン、セロトニン受容体結 合阻害	シグマアルドリ ッチ
オランザピン	ドーパミン、セロトニン受容体結 合阻害	和光純薬

## 結果

### 炭酸脱水酵素阻害剤によるゼブラフィッシュ胚への影響

スルホンアミド系炭酸脱水酵素(CA)阻害剤であるエトキシゾルアミド(EZA)、アセタゾルアミド(AZA)、ドルゾルアミド(DZA)をゼブラフィッシュ胚の受精後 6 時間から 5 日目まで暴露した。3 化合物ともに耳石低形成、浮腫、遊泳不良等の影響を示し、その中で最も影響が強かったのは EZA であった。EZA は 0.63 ppm 以上の濃度で死亡例が増加し、0.63 ppm で 17%、1.3 ppm で 83%、2.5 ppm では 100%の胚が死亡した。0.63 ppm で生存した胚では耳石低形成、ヒレやアゴの形態異常、脊索弯曲、浮腫、遊泳不良等の影響がみられた。0.16 ppm では全ての胚で耳石低形成と遊泳不良がみられたが、その他異常はみられなかった。さらに 0.078ppm では数例で耳石低形成と遊泳不良がみられた。0.039 ppm では異常はみられなかった(Table 1, Fig. 1)。AZA は 500 ppm においても死亡はみられなかったが、耳石低形成および遊泳不良がみられた。それら影響は 130 ppm でもみられ、16 ppm 以下は全例が正常に発生した(Table 2, Fig. 1)。DZA も 500 ppm においても死亡はみられなかったが、耳石低形成および遊泳不良が全例で、心臓浮腫と卵黄囊浮腫が 92%、アゴ形態異常が 25%、脊索弯曲が 8%みられた。250 ppm でも同様の所見がみられたが、アゴ形態異常や浮腫の発生頻度は 500 ppm に比べ低下した。耳石低形成と遊泳不良は 3.9 ppm においても全例でみられ、2.0 ppm でも 17%、0.49 ppm では遊泳不良が 8%みられた(Table 3, Fig. 1)。

### 性ホルモンに作用する化合物によるゼブラフィッシュ胚への影響

雌性ホルモンであるエストロゲンを産生する酵素であるアロマターゼを阻害するアナストロゾールおよびレトロゾールをゼブラフィッシュ胚に暴露した。アナストロゾールは 250 ppm で死亡が 8%、未孵化が 91%、心臓及び卵黄囊浮腫、遊泳不良を併発した個体が 8%であった。130 ppm では未孵化 17%、孵化遅延がみられた個体に心臓、卵黄囊および頭部に浮腫がみられ、遊泳にも異常がみられた。62 ppm においても未孵化が 8%、孵化遅延が 9%、心臓浮腫が 9%で発生した。31 ppm 以下では異常個体はみられなかった(Table 4, Fig. 2)。一方でレトロゾールは供試した全ての濃度で影響はみられなかった(Table 5)。

雄性ホルモンであるアンドロゲンの受容体結合阻害剤であるフルタミドを暴露した胚は 5 および 10 ppm で全例が死亡したが、2.5 ppm 以下では死亡はみられなかった。2.5 ppm で遊泳不良が 92%、心臓浮腫が 8%みられたが、それ以下の濃度は正常であった(Table 6, Fig. 2)。

アンドロゲンを産生する酵素である  $5\alpha$  レダクターゼを阻害するフィナステリドを暴露した胚では 50 および 100 ppm で全例が死亡した。25 ppm では心拍低下が 45%、耳石低形成が 100%、脊索弯曲が 64%、心臓浮腫が 91%、卵黄囊浮腫が 100%、尾びれ形態異常が 9%、遊泳不良が 100%みられた。13 ppm では遊泳不良が 33%みられ、それ以下の濃度では影響はなかった (Table 7, Fig. 2)。

#### 甲状腺ホルモン合成を阻害する化合物によるゼブラフィッシュ胚への影響

甲状腺ホルモンを産生する甲状腺ペルオキシダーゼ (TPO) を阻害するプロピルチオウレア (PTU) をゼブラフィッシュ胚に暴露したところ、2.6 ppm では全例が孵化遅延および色素欠乏を生じ、心臓浮腫および遊泳不良が 17% でみられた。1.3 ppm では孵化遅延が 27% みられたものの、孵化後は正常に発生した (Table 8, Fig. 3)。

メルカプトメチルイミダゾール (MMI) は 7.5 ppm を暴露した胚で全例未孵化がみられ、脊索弯曲が 8% で生じたが、それ以下の濃度では異常はみられなかった (Table 9, Fig. 3)。

エチレンチオウレアは 25000 ppm で全例、5000 ppm で 25% 死亡がみられた。5000 ppm の生存例は全例未孵化であった。1000 ppm では遊泳不良が 8% みられた (Table 10, Fig. 3)。

#### 神経伝達物質を阻害する化合物によるゼブラフィッシュ胚への影響

神経伝達物質であるドーパミンやセロトニンの受容体結合を阻害するロキサピンおよびオランザピンをゼブラフィッシュ胚に暴露したところ、ロキサピンでは 5 および 10 ppm では全例死亡し、2.5 ppm では半数例死亡した。2.5 ppm の生存例は未孵化が 17%、心拍低下が 20%、体軀矮小が 80%、脊索異常が 100%、心臓および卵黄囊浮腫が 100%、頭部および全身浮腫が 20%、遊泳不良が 100% の個体でみられた。1.3 ppm でも心拍低下、ヒレ低形成、遊泳不良の発生頻度は高かった (Table 11, Fig. 4)。

オランザピンは 50 および 100 ppm で全例胚死亡がみられた。25 ppm の致死率は 8% であり、生存例は未孵化が 9%、脊索異常が 45%、脊索弯曲が 27%、アゴ形態異常が 73%、心臓浮腫が 55%、卵黄囊浮腫が 18%、遊泳不良が 91% みられた。13 ppm も脊索異常が 17%、アゴ形態異常が 42%、遊泳不良が 67% でみられた (Table 12)。

## 考察

魚類の胚発達過程に対して特異的な影響を与える化学物質を検索するため、胚発達・成長に必要なタンパクやホルモンに影響を及ぼすと想定した化合物をゼブラフィッシュ胚に暴露した。

評価した CA 阻害剤、性ホルモン産生阻害剤、甲状腺ホルモン産生阻害剤のうち、最も低濃度までゼブラフィッシュ胚発生に影響を及ぼした化合物は CA 阻害剤の EZA であり、EC<sub>50</sub>である 0.08ppm において耳石低形成や遊泳不良が生じた (Table 1)。CA 阻害剤である AZA および DZA を暴露した胚においても耳石低形成および遊泳不良がみられており形態学的にも類似性が認められた (Table 1-3, Fig. 1)。成魚の内耳石灰化には内耳上皮細胞に発現する CA が関与すると報告があり (Tohse et al., 2004 ; Tohse et al., 2006)、胚発達期にも同様に耳石低形成がみられたのではないかと考えられた。

性ホルモンであるエストロゲンやアンドロゲンはゼブラフィッシュ胚発生過程において骨形成や脳や眼球などの組織形成に寄与する (Fushimi et al., 2009 ; Gorelick et al., 2008) ことから、阻害剤暴露により形態異常が生じることが想定された。しかしながらレトロゾールを除く全ての供試化合物の暴露にて影響がみられたが、化合物の作用性と毒性影響については特出すべき関連性はみられなかった。いずれの化合物もヒト組織の受容体や酵素に対しては低濃度で薬効を示す化合物にも関わらず、ゼブラフィッシュ胚への影響は弱かった。

甲状腺ホルモン産生を阻害する PTU、MMI、エチレンチオウレアは高濃度ではあったがいずれも孵化への影響を示した (Table 8, 9, 10, Fig. 3)。魚類を含む脊椎動物において、甲状腺ホルモンは発生や成長に寄与するホルモンであり、今回いずれの化合物でもみられた孵化への影響は甲状腺ホルモン産生阻害による成長遅延によるものと想像された。また PTU でみられた色素欠乏は甲状腺ホルモンおよびメラニン色素の共通前駆体であるチロシンが甲状腺への阻害作用により欠乏しメラニン合成への作用したのではないかと推察した。

神経伝達物質であるドーパミンやセロトニンの受容体結合を阻害するロキサピンおよびオランザピンをゼブラフィッシュ胚に暴露したところ、いずれも複合的な形態異常がみられた (Table 11, 12)。両化合物に共通してみられた脊索異常は非常に特徴的な所見である。体の中軸をなす脊索に蛇行や断裂がみられ、脊索の配列に異常を示す個体もみられた。脊索異常やアゴ形態異常は神経管形成異常を示唆するような所見であり、哺乳類でみられる神経管閉鎖阻害や口蓋裂等も異常所見とも類似性がみられた (Fig. 4)。神経伝達物質である GABA 受容体を阻害する農薬をゼブラフィッシュ胚に暴露させると、ロキサピンやオランザピンと同様に脊索走行や断裂、アゴ形態異常

がみられた(data not shown)。発達期における神経伝達物質は魚類の脊索形成や神経管閉鎖に影響を及ぼす可能性が示唆された。神経伝達物質阻害作用を有する殺虫剤や動物薬は広く汎用されていることや発達期の神経障害は成長後に影響を及ぼす可能性があるため、環境生物への発達神経毒性評価は重要と考える。

ゼブラフィッシュとヒトの遺伝子相同性は完全に保存されているものが 56%、ある程度保存されているものが 24%であり、80%近くの遺伝子は高い相同性を有するため、医薬品や農薬で動物に毒性影響がみられた化合物は魚類にも影響を及ぼすリスクは高い。今回供試した化合物はレトロゾール以外の化合物で異常を誘発することが確認された。CA 阻害剤、甲状腺ホルモン合成阻害剤、神経伝達物質阻害は発生過程に特徴的な毒性影響を示すことが明らかとし、化学物質の環境リスク評価においてゼブラフィッシュ胚を用いた毒性評価は簡易かつ高感度の評価系として利用できると考えられた。

Table 1 エトキシゾルアミドによるゼブラフィッシュ胚への影響

EZA (ppm)	致死率 (%)	正常な胚 (%)	異常を生じた胚(%)							
			耳石 低形成	胸びれ 弯曲	アゴ 形態異常	脊索弯曲	心臓浮腫	卵黄囊 浮腫	尾びれ 形態異常	遊泳不良
0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
0.039	0	92	0	0	0	0	0	0	0	8
0.078	0	50	17	0	0	0	0	0	0	50
0.156	0	0	100	0	0	0	0	0	0	100
0.31	0	0	100	0	0	0	17	17	17	100
0.63	17	0	100	33	20	40	50	90	100	100
1.3	83	0	100	50	50	100	100	100	100	100
2.5	100	0	-	-	-	-	-	-	-	-

試験例数は各濃度n=12. 異常を生じた胚(%)は受精後5日に生存した胚に対する割合を示す。-: 全例死亡のため観察せず。

Table 2 アセタゾルアミドによるゼブラフィッシュ胚への影響

AZA (ppm)	致死率 (%)	正常な胚 (%)	異常を生じた胚 (%)							
			耳石 低形成	胸びれ 弯曲	アゴ 形態異常	脊索弯曲	心臓浮腫	卵黄囊 浮腫	尾びれ 形態異常	遊泳不良
0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
3.9	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
7.8	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
31	0	83	0	0	0	0	0	0	0	17
62	0	67	17	0	0	0	0	0	0	33
130	0	0	100	0	0	0	0	0	0	100
250	0	0	100	0	0	0	0	0	0	100
500	0	0	100	0	17	0	42	17	0	100

試験例数は各濃度n=12. 異常を生じた胚(%)は受精後5日に生存した胚に対する割合を示す。

Table 3 ドルゾルアミドによるゼブラフィッシュ胚への影響

DZA (ppm)	致死率 (%)	正常な胚 (%)	異常を生じた胚 (%)							
			耳石 低形成	胸びれ 形態異常	アゴ 形態異常	脊索弯曲	心臓浮腫	卵黄囊 浮腫	尾びれ 形態異常	遊泳不良
0	8	92	0	0	0	0	0	0	0	0
0.49	0	92	0	0	0	0	0	0	0	8
0.98	8	91	0	0	0	0	0	0	0	9
2.0	0	58	17	0	0	0	0	0	0	42
3.9	0	0	100	0	0	0	0	0	0	100
7.8	0	0	100	0	0	0	0	0	0	100
16	0	0	100	0	0	0	0	0	0	100
31	0	0	100	0	0	0	0	0	0	100
63	0	0	100	0	0	0	25	0	0	100
125	0	0	100	0	0	0	50	0	0	100
250	0	0	100	0	17	0	83	33	0	100
500	0	0	100	0	25	8	92	92	0	100

試験例数は各濃度n=12, 異常を生じた胚(%)は受精後5日に生存した胚に対する割合を示す。



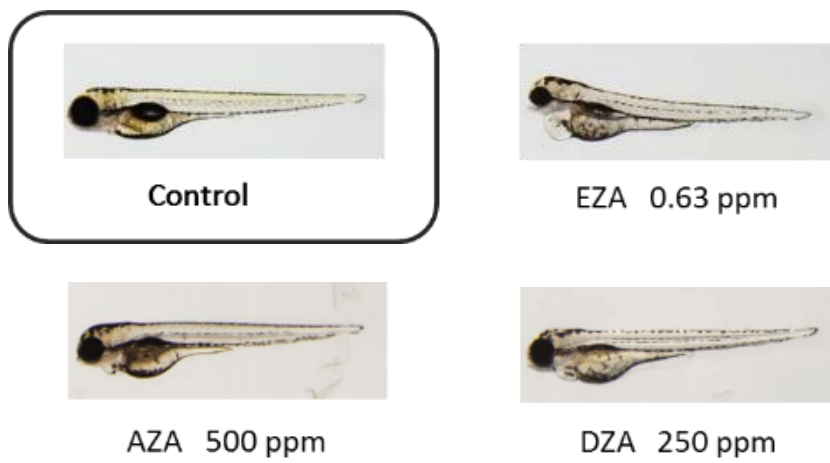


Fig. 1 CA 阻 害 剤 によるゼブラフィッシュ胚への影響

**Table 4 アナストロゾールによるゼブラフィッシュ胚への影響**

Anastrozole (ppm)	致死率 (%)	正常な胚 (%)	異常を生じた胚 (%)					
			未孵化	孵化遅延	心臓浮腫	卵黄囊 浮腫	頭部浮腫	遊泳不良
0	0	100	0	0	0	0	0	0
16	0	100	0	0	0	0	0	0
31	0	100	0	0	0	0	0	0
62	0	17	8	9	9	0	0	0
130	0	75	17	10	10	10	10	10
250	8	0	91	0	8	8	0	8

試験例数は各濃度n=12, 異常を生じた胚(%)は受精後5日に生存した胚に対する割合を示す。

Table 5 レトロゾールによるゼブラフィッシュ胚への影響

Letrozole (ppm)	致死率 (%)	正常な胚 (%)	異常を生じた胚 (%)							
			耳石 低形成	胸びれ 弯曲	アゴ 形態異常	脊索弯曲	心臓浮腫	卵黄囊 浮腫	尾びれ 形態異常	遊泳不良
0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
3.9	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
7.8	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	92	0	8	0	0	0	0	0	0
31	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
62	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
130	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0

試験例数は各濃度n=12, 異常を生じた胚(%)は受精後5日に生存した胚に対する割合を示す。

Table 6 フルタミドによるゼブラフィッシュ胚への影響

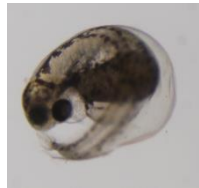
Flutamide (ppm)	致死率 (%)	正常な胚 (%)	異常を示した胚 (%)	
			心臓浮腫	遊泳不良
0	0	100	0	0
0.625	0	100	0	0
1.25	0	100	0	0
2.5	0	92	8	92
5	100	0	—	—
10	100	0	—	—

試験例数は各濃度n=12, 異常を生じた胚(%)は受精後5日に生存した胚に対する割合を示す。

Table 7 フィナステリドによるゼブラフィッシュ胚への影響

Finasteride (ppm)	致死率 (%)	正常な胚 (%)	異常を示した胚 (%)						
			心拍低下	耳石 低形成	脊索弯曲	心臓浮腫	卵黄嚢浮腫	尾びれ 形態異常	遊泳不良
0	0	92	0	0	0	0	0	0	8
6.3	0	100	0	0	0	0	0	0	0
13	0	67	0	0	0	0	0	0	33
25	8	0	45	100	64	91	100	9	100
50	100	–	–	–	–	–	–	–	–
100	100	–	–	–	–	–	–	–	–

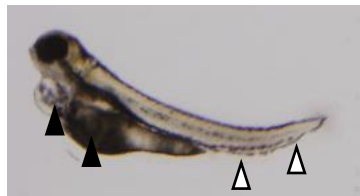
試験例数は各濃度n=12, 異常を生じた胚(%)は受精後5日に生存した胚に対する割合を示す。



アナストロゾール 130 ppm  
(未孵化、心臓浮腫)



フルタミド 2.5 ppm  
(4dpf 孵化遅延)



フィナステリド 25 ppm  
(心臓・卵黄嚢浮腫、脊索弯曲)

Fig. 2 性ホルモンに作用する化合物によるゼブラフィッシュ胚への影響

Table 8 プロピルチオウレアによるゼブラフィッシュ胚への影響

PTU (ppm)	致死率 (%)	正常な胚 (%)	孵化遅延	異常を示した胚 (%)		
				色素欠乏	心臓浮腫	遊泳不良
0	0	92	0	0	0	8
0.33	0	100	0	0	0	0
0.65	0	100	0	0	0	0
1.3	0	73	27	0	0	0
2.6	0	0	100	100	17	17

試験例数は各濃度n=12, 異常を生じた胚(%)は受精後5日に生存した胚に対する割合を示す。

Table 9 メルカプトメチルイミダゾールによるゼブラフィッシュ胚への影響

MMI (ppm)	致死率 (%)	正常な胚 (%)	異常を示した胚 (%)	
			未孵化	脊索弯曲
0	0	100	0	0
0.06	0	100	0	0
0.3	0	100	0	0
1.5	0	100	0	0
7.5	0	0	100	8

試験例数は各濃度n=12, 異常を生じた胚(%)は受精後5日に生存した胚に対する割合を示す。



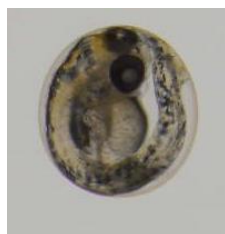
Table 10 エチレンチオウレアによるゼブラフィッシュ胚への影響

エチレンチオウレア (ppm)	致死率 (%)	正常な胚 (%)	異常を示した胚 (%)	
			未孵化	遊泳不良
0	0	92	0	8
200	0	100	0	0
1000	0	92	0	8
5000	25	0	100	—
25000	100	—	—	—

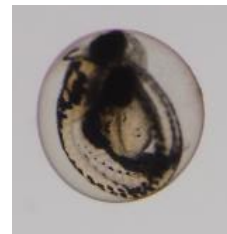
試験例数は各濃度n=12, 異常を生じた胚(%)は受精後5日に生存した胚に対する割合を示す。



PTU 2.6 ppm  
(孵化遅延、色素欠乏)



MMI 7.5 ppm  
(未孵化)



エチレンチオウレア  
25000 ppm  
(未孵化)

**Fig. 3 甲状腺ホルモン産生を阻害する化合物によるゼブラフィッシュ胚への影響**

Table 11 ロキサピンによるゼブラフィッシュ胚への影響

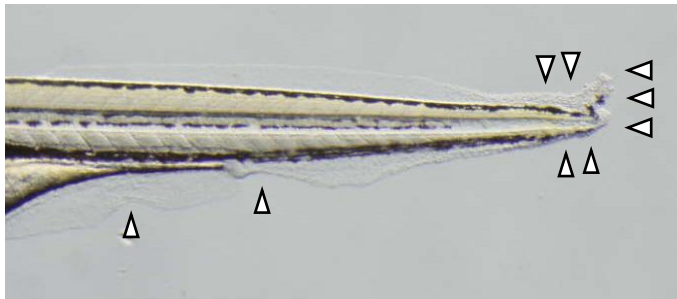
ロキサピン (ppm)	致死率 (%)	正常な胚 (%)	異常を示した胚 (%)										
			未孵化	心拍低下	体軀矮小	脊索異常	アゴ 形態異常	ヒレ低形成	心臓浮腫	卵黄嚢浮腫	頭部浮腫	全身浮腫	遊泳不良
0	0	92	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8
0.31	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.63	0	92	0	0	8	0	0	8	0	0	0	0	8
1.3	8	36	0	45	0	0	0	64	9	9	0	0	64
2.5	50	0	17	20	80	100	0	0	100	100	20	20	100
5	100	0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
10	100	0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

試験例数は各濃度n=12, 異常を生じた胚(%)は受精後5日に生存した胚に対する割合を示す。

Table 12 オランザピンによるゼブラフィッシュ胚への影響

オランザピン (ppm)	致死率 (%)	正常な胚 (%)	異常を示した胚 (%)						
			未孵化	脊索異常	脊索弯曲	アゴ 形態異常	心臓浮腫	卵黄嚢浮腫	遊泳不良
0	8	87	9	0	0	0	0	0	9
6.3	0	87	8	0	0	0	0	0	8
13	0	33	8	17	0	42	0	0	67
25	8	0	9	45	27	73	55	18	91
50	100	0	—	—	—	—	—	—	—
100	100	0	—	—	—	—	—	—	—

試験例数は各濃度n=12, 異常を生じた胚(%)は受精後5日に生存した胚に対する割合を示す。



ロキサピン 1.3ppm ヒレ低形成



ロキサピン 2.5ppm 脊索弯曲

Fig. 4 ロキサピンによるゼブラフィッシュ胚への影響

Table 13 各化合物のゼブラフィッシュ胚に対する LC<sub>50</sub> および EC<sub>50</sub>

化合物	作用	LC <sub>50</sub> (ppm)	EC <sub>50</sub> (ppm)
EZA	CA阻害	0.89	0.08
AZA	CA阻害	> 500	67.8
DZA	CA阻害	> 500	2.1
Anastrozole	アロマターゼ阻害	> 250	200
Letrozole	アロマターゼ阻害	> 130	> 130
Flutamide	AR結合阻害	5	1.8
Finasteride	5α レダクターゼ阻害	30	13
PTU	TPO阻害	> 2.6	1.4
MMI	TPO阻害	> 7.5	7.2
エチレンチオウレア	TPO阻害	5900	1400
ロキサピン	ドパミンR・セロトニンR結合阻害	2.5	1.2
オランザピン	ドパミンR・セロトニンR結合阻害	27	11

## 第二章 ゼブラフィッシュ胚発生過程における耳石形成および炭酸脱水酵素の関与

### 背景

炭酸脱水酵素(CA)は、二酸化炭素と水から重炭酸イオンと水素イオンの産生を触媒する酵素であり、動物、植物、菌類等広く生物界に存在し、各生体内では多くの器官、組織でイオン輸送や pH 調節等生体の恒常性維持に貢献している。脊椎動物では 18 種のアイソフォームが存在し、機能や局在はそれぞれ異なる(Gilmour et al., 2009; Sly and Hu, 1995; Chegwiddden and Carter, 2000; Hilvo et al., 2008)。ゼブラフィッシュにおいても、鰓、肝臓、心臓、腎臓、表皮、脳、尾等多くの組織に局在し、胚発達過程においては器官や臓器形成や発達に大きく貢献する酵素である(Aspatwar, 2013; Lin et al., 2008; Liao et al., 2009; Ito et al., 2013)。成魚では内耳のイオノサイトおよび扁平上皮細胞に発現し耳石石灰化に寄与する(Tohse et al., 2004; Tohse et al., 2006; Shaio et al.; 2005; Beier and Anken, 2006)。胚発達期における報告は限られており、cichlid fish で初期胚から CA が内耳上皮細胞のイオノサイトに活性がみられ、内リンパ液へのイオン供給や pH 維持に寄与していると報告されているに留まる(Beier et al., 2008)。さらに前述の報告では CA のアイソフォームは未同定であり、内耳上皮細胞の CA 発現部位が魚種によって異なると言及されており不明な点が多く残る。

本章では、全ゲノム配列が明らかとなっているモデル生物であるゼブラフィッシュを用い聴覚や平衡覚が形成する期間であり、耳石や感覚受容器である neuromast の形成や発達が活発に生じる時期である受精後 5 日までの耳石形成、石灰化、および石灰化に関わると考えられる内耳における CA の局在について調べた。今回は、哺乳類で内耳に発現がみられている 8 種の CA アイソフォームについて内耳および胚全体での発現量について調べ、CA2a および CA15a については免疫組織化学染色にてタンパク質の発現、局在についても確認した。

## 方法

### 使用生物

(独)理化学研究所から分譲された 5~10 か月 齢の雌雄のゼブラフィッシュ(RIKEN WT, *Danio rerio*) を用いた。

### 飼育条件

飼育には流水式水槽(名東水園)を用い、水温 28.5 °C、光条件(明 14 時間、暗 10 時間)に雌雄別に飼育し、1 日 4 回粉末飼料、うち 2 回は雌のみブラインシュリンプも給餌した。

### 受精卵採取

受精卵を採取する前日夕方に雌雄のゼブラフィッシュを交配させ、翌朝受精卵を得た。得られた受精卵はシャーレに移し 10%クロラミン T 含有 0.3×Danieau's solution [17.4 mM NaCl, 0.21 mM KCl, 0.12 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.18 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 1.5 mM HEPES pH 7.2; Gustafson et al., 2012]にて消毒した後、0.3×Danieau's solution で 3 回洗浄した。洗浄後 28°Cで受精後 6 時間までインキュベートした。受精 6 時間後に実体顕微鏡下で正常発生している胚を 24 well plate に移した(1 embryo/well)。各実験の観察日またはサンプリング日まで 28°Cでインキュベートした。

### 走査型電子顕微鏡標本の作製

各発生ステージの胚(1, 2, 3, 5 dpf)をトリカイン過麻酔で安楽死させ、2.5%グルタルアルデヒドにて一晚固定した。50%-70%-90%-95%-99%-100%エタノールで段階的に脱水し、t-ブチルアルコールに置換させた後、凍結乾燥させた。凍結乾燥したサンプルをオスミウム酸で後固定し、走査型電子顕微鏡 (JCM-5700, 日本電子)にて観察した。

### 耳石面積の測定

各発生ステージの胚(1, 2, 3, 5 dpf)をトリカインで麻酔し、実体顕微鏡(M125, Leica)下で耳石面積を測定した。面積測定には ImageJ software (version 1.49, National Institutes of Health)を用いた。



### 耳石の Calsein 染色

各発生ステージの胚(1, 2, 3, 5 dpf)を 0.2% Calcein 水溶液にて 30 分間染色し、蒸留水で洗浄し、トリカイン過麻酔で安楽死させ、耳石を摘出した。摘出した耳石は蛍光顕微鏡(Leica DM2500)にて観察した。

### 耳石面積の測定

各発生ステージの胚(1, 2, 3, 5 dpf)をトリカインで麻酔し、実体顕微鏡(M125, Leica)下で耳石面積を測定した。面積測定には ImageJ software (version 1.49, National Institutes of Health)を用いた。

### 組織標本作成

各発生ステージの胚(1, 2, 3, 5 dpf)をトリカイン過麻酔で安楽死させ、10%中性ホルマリン緩衝液にて 1 週間程度固定させた。常法に従い、パラフィン切片(厚さ 3 $\mu$ m)を作製し、HE 染色、von Kossa 染色もしくは免疫組織化学染色を施し、光学顕微鏡にて観察した。

### Morpholino oligonucleotide のマイクロインジェクション

Ito らの方法に従い、CA2a および CA15a に対する Antisense Morpholino oligonucleotides(MO)約 3ng を含む 1×Danieau's solution をゼブラフィッシュの 1 細胞期胚の卵黄嚢に注入し各遺伝子をノックダウンさせた。5dpf 胚を過麻酔させた後、上記に従い組織標本作製した。

### 免疫組織化学染色

脱パラフィンした切片を水洗し、1mM EDTA(pH 9.0)にて 20 分間電子レンジにて加熱し抗原を賦活化させた。0.25%Triton を含む PBS (PBST) にて 5 分間 3 回洗浄後、0.5%過酸化水素を含むメタノールで 30 分間反応させ、PBST にて洗浄し、次に 1%ヤギ血清を含む PBST で 30 分間反応させ非特異的反応を抑制させた。CA2a もしくは CA15a に対する抗ウサギ血清(Ito et al., 2013; 東京工業大学 理工学院 中村信大氏より供与いただいた)を 30 分間反応させ、PBST にて洗浄した。次に、二次抗体ならびにその発色には、Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories)、Vector SG peroxidase substrate kit (Vector Laboratories)を用い、二次抗体を 30 分間反応させた後、PBST で洗浄し発色試薬を反応させた。切片を水洗し、エタノールおよびキシレンにて脱水透徹したのち Entellan new(Merck Millipore)に封入した。切片は光学顕微鏡にて観察した。

### 耳石中カルシウム濃度の測定

各発生ステージの胚(1, 2, 3, 5 dpf)をトリカイン過麻酔で安楽死させ、耳石を単離した。単離した耳石に 1N 塩酸を加え溶解させ、8N KOH にて pH12~13 に調製した。NN 指示薬(同仁化学)を数滴滴下後 EDTA にて滴定し、カルシウム濃度を求めた。

### Real-time PCR 法による胚および内耳 CA mRNA の定量

3 および 5 dpf の胚もしくは単離した内耳(いずれも約 40 匹分)から Nucleo spin reagents(タカラバイオ)を用いて Total RNA を抽出した。抽出した RNA は濃度および純度を測定した後、Primescript RT reagent kit(タカラバイオ)にて cDNA を合成した。Real-time PCR にて CA アイソフォーム(CA2a、2b、7、8、9、12、14、15a)の発現量を定量した。その際には  $\beta$ -actin を内部標準として用いた。

## 結果

### ゼブラフィッシュ胚における内耳および耳石の発達

耳石は聴覚および平衡感覚を司る器官であり、魚類で発生学的に最も初期に形成される硬組織であることが知られている(Radtke and Dean, 1982; Murayama et al., 2002; Inoue et al., 2013)。ゼブラフィッシュの内耳形成は受精後 1 日よりみられ、耳胞となるくぼみが形成され、その中に 2 つの耳石(卵形囊耳石、球形囊耳石)が観察された。孵化がみられる受精後 3 日には、耳胞部に囊状構造が観察され、球形囊耳石は卵形囊耳石に比べ大きく成長した(Fig. 1-3)。

また耳胞部の組織切片を作製し詳細に内耳を観察したところ、受精後 1 日では内耳の原基となる耳胞部にくぼみ(内腔)が観察され、内耳上皮細胞層上部には耳石を形成する多数の微細な粒子が確認された。受精後 2 日には、粒子が集合、凝集し部分的にカルシウム沈着が確認された。受精後 3 日は、内腔が拡張し囊状構造が形成された。耳石は KOSSA 染色により外層から石灰化しているように観察された。受精後 5 日では耳胞の内腔がさらに拡張し、内柱の伸長もみられた(Fig. 4)。

耳石も成長しカルシウム濃度は受精後 3 日に比べ 1.7 倍増加し、耳石石灰化が急速に進んでいることが確認された(Fig. 5, 6)。

### ゼブラフィッシュ胚の内耳発達過程での炭酸脱水酵素(CA)の発現と局在

魚類の耳石の主成分は炭酸カルシウムであり、卵形囊、球形囊とよばれる袋状の器官内の中に浮遊している。袋は内リンパ液で満たされており、外界からのイオン供給により重炭酸イオンおよびカルシウムイオンから結晶化されることが知られている。内リンパ液へのイオン輸送は、内耳上皮細胞イオノサイトに局在する炭酸脱水酵素(CA)や  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  transporter を介し供給される(Tohse et al., 2001)。ゼブラフィッシュの内耳における CA 発現や局在に関する報告はほとんどないため CA2a および CA15a 抗体を用い(Ito et al., 2013)、ゼブラフィッシュ胚発生過程における内耳上皮細胞の CA の発現および局在を確認した(Fig. 7)。受精後 1 日では CA2a、CA15a いずれもほとんど発現していなかったが、耳石に部分的なカルシウム沈着がみられた受精後 2 日には、CA2a、CA15a が有毛細胞およびイオノサイトに発現していることが確認された。細胞質タンパクである CA2a は有毛細胞全体に染色性がみられ、膜貫通領域を有する CA15a は有毛細胞頂端部および底部に局在していた。有毛細胞の発現量は CA15a に比べ CA2a の方が高かったが、イオノサイトの発現量は CA2a、CA15a いずれも高発現であった。また CA2a もしくは CA15a 遺伝子をノックダウンさせた Morpholino oligonucleotide(MO)をゼブラフィッシュ受精卵に注入した標本(MO-injected)で CA2a、CA15a とともに内耳上皮細胞に染色性はみられなかった。よ

って、MO 標本からも CA2a および CA15a の局在を確定されることができた。次に  
その他 CA アイソフォームの発現を確認するために受精後 3 日もしくは 5 日の内耳お  
よび胚から Total RNA を抽出し、Real-time PCR にて CA2a, 2b, 7, 8, 9, 12, 14,  
15a の計 8 遺伝子の発現量を調べた(Fig. 8)。胚全体では受精後 3 日および 5 日にお  
いて評価した全ての遺伝子がほぼ同等の発現量を示し、CA2a、2b の発現量が他アイ  
ソフォームより高かった。さらに内耳を単離して調べたところ、内耳でも CA2a およ  
び CA2b の発現量が高く、CA12 および CA14 は受精後 3 日の時点に比べ受精後 5 日  
の方が高い発現量を示すことを明らかにした(Fig. 9)。

## 考察

ゼブラフィッシュ胚の耳石形成は受精後 1 日より始まり、耳胞となるくぼみが形成され 2 つの耳石(卵形囊耳石、球形囊耳石)も観察された。2 日目には耳石にカルシウム沈着が確認され、その後孵化以降急速に石灰化が進行した(Fig. 1-4)。また耳石石灰化開始と同時期に内耳上皮細胞には CA2a および 15a の発現がみられており、これら CA の発現が内リンパ液への重炭酸イオン供給に寄与し石灰化を進行させていると推察された(Fig.5-7)。細胞質タンパクである CA2a は内耳上皮細胞の有毛細胞全体、およびイオノサイトに発現し、膜タンパクである CA15a は有毛細胞の頂端部および底部、およびイオノサイトに局在していた(Fig. 7)。魚類の内耳における CA の局在についての報告は限られている。先行研究ではサーモンやニジマスの成魚、Cichlid fish 胚ではイオノサイトに CA の発現が確認されているが、有毛細胞に CA は局在していない(Tohse et al., 2006, Mayer-Gostan et al., 1996)。しかしながら、ゼブラフィッシュ成魚には CA が有毛細胞に発現しており(Shiao et al., 2005)、CA の局在は種間差がある可能性が示唆されている。本研究ではゼブラフィッシュの内耳有毛細胞に CA が発現することを示した先行研究を支持し、さらに CA2a および 15a というアイソフォームを確認した初めての報告である。

マウスの胎児および新生児の内耳上皮有毛細胞には CA2 および CA11 が局在することが確認されており(Wu et al., 2012)、音を感知する際に繊毛先端部でのイオン輸送や細胞内酸塩基平衡に関与すると報告されている(Wu et al., 2012; Okamura et al., 1996)。ゼブラフィッシュで有毛細胞に確認された CA2a は哺乳類有毛細胞に存在する CA と相同性が高く、ゼブラフィッシュの聴覚や平衡覚の機能制御に関与している可能性があると考えられた。今後は CA の機能および CA を介し産生される  $\text{HCO}_3^-$  を輸送する  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  交換体、 $\text{HCO}_3^-$ -ATPase 等との関わりを含め詳細に解析を行いたい。

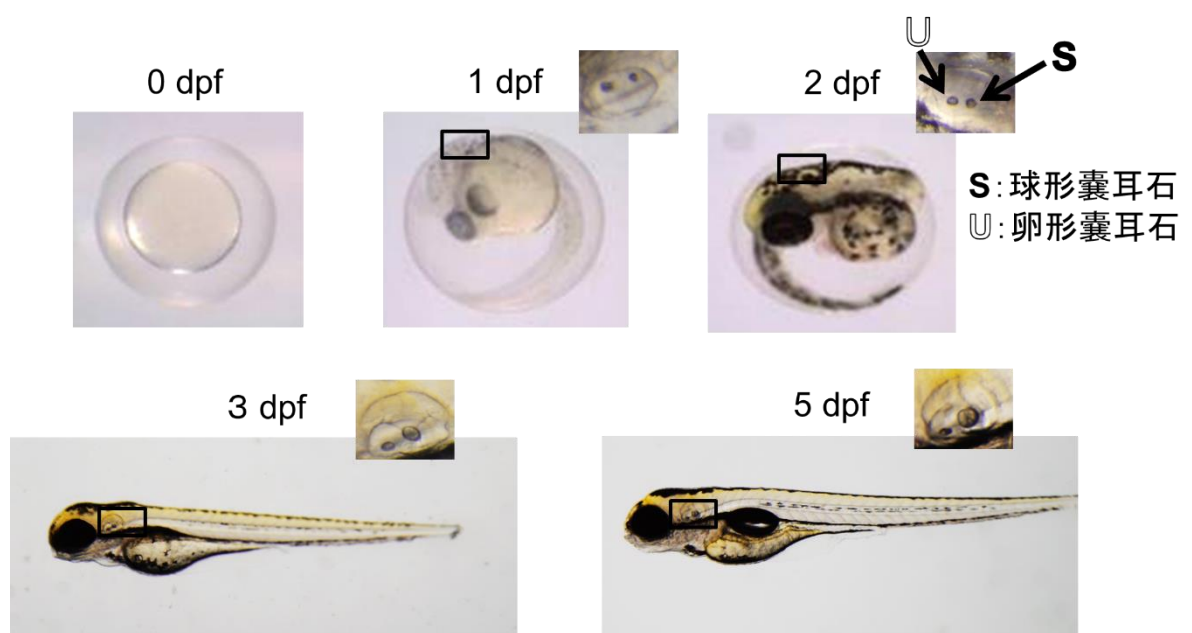


Fig. 1 ゼブラフィッシュ胚および内耳の発達

ゼブラフィッシュ胚(0, 1, 2, 3, 5 dpf)を麻酔させ、実体顕微鏡下で胚および内耳の発達過程を観察した。

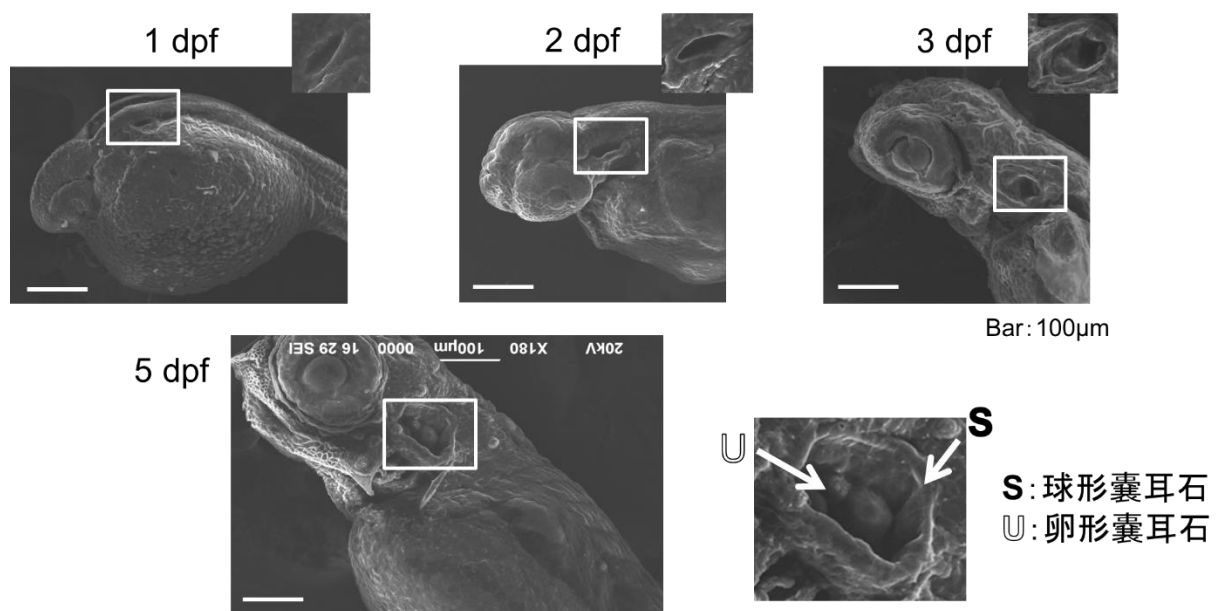


Fig. 2 走査型電子顕微鏡によるゼブラフィッシュ胚の観察

ゼブラフィッシュ胚(1, 2, 3, 5 dpf)を固定・凍結乾燥後、オスミウムで後固定し走査型顕微鏡で観察した(×180)。  
bar=100 μm

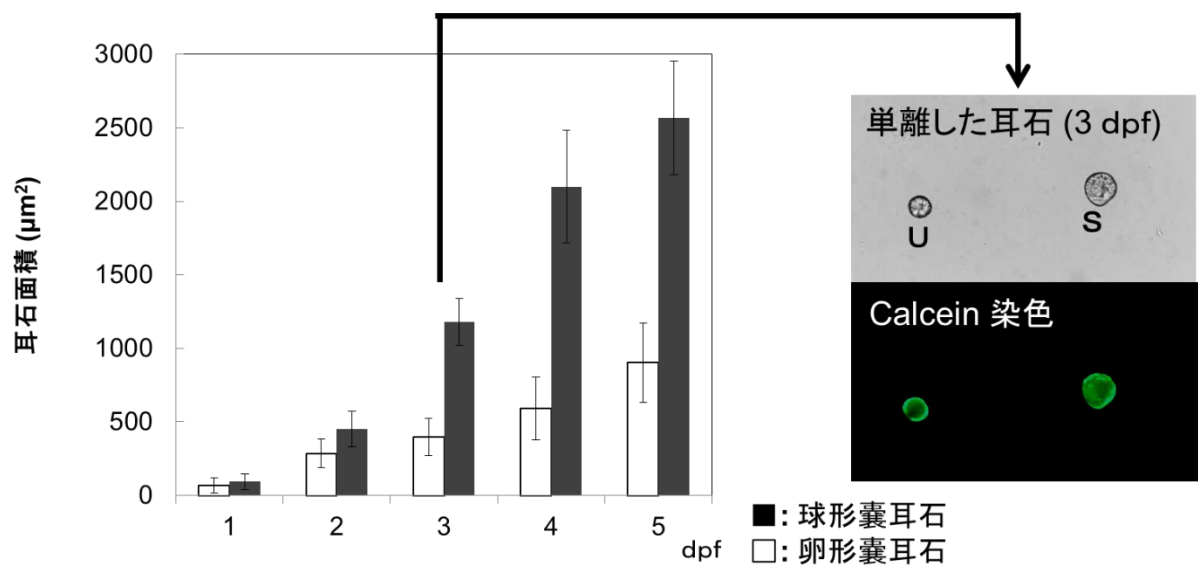


Fig. 3 ゼブラフィッシュ胚発生過程における耳石面積の推移と耳石石灰化

ゼブラフィッシュ胚の球形囊耳石および卵形囊耳石の面積を経時的に測定した (n=12, 平均値±標準偏差)。

受精後 3 日胚より単離した耳石(U: 卵形囊耳石、S: 球形囊耳石)に Calcein 染色を施し、蛍光顕微鏡にて観察した。



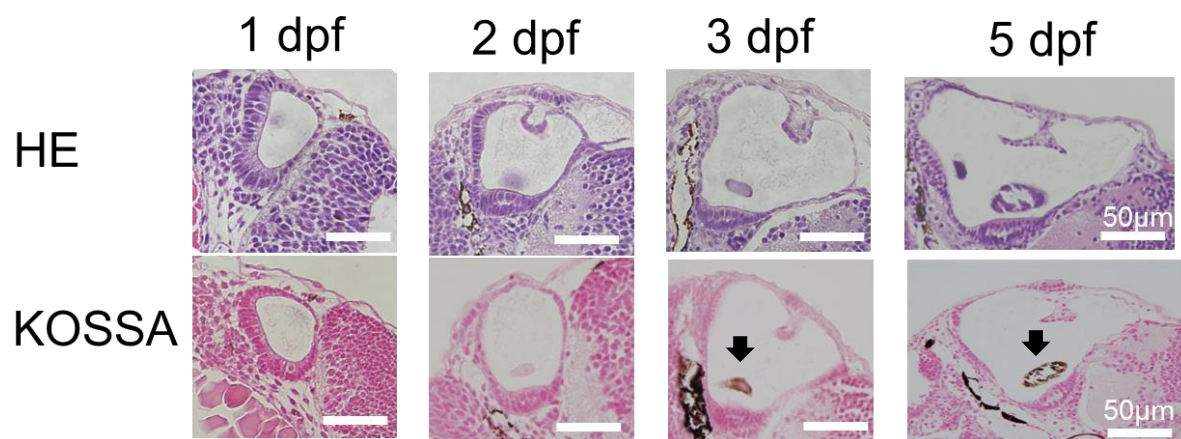


Fig. 4 ゼブラフィッシュ胚発生過程における耳石石灰化

ゼブラフィッシュ胚(1, 2, 3, 5 dpf)を常法にてパラフィン包埋し、耳胞の横断面にて切片を作製し HE 染色もしくは von KOSSA 染色(カルシウム染色)を施した。bar=50  $\mu$ m。矢印は茶褐色を呈した KOSSA 染色陽性の耳石を示す。

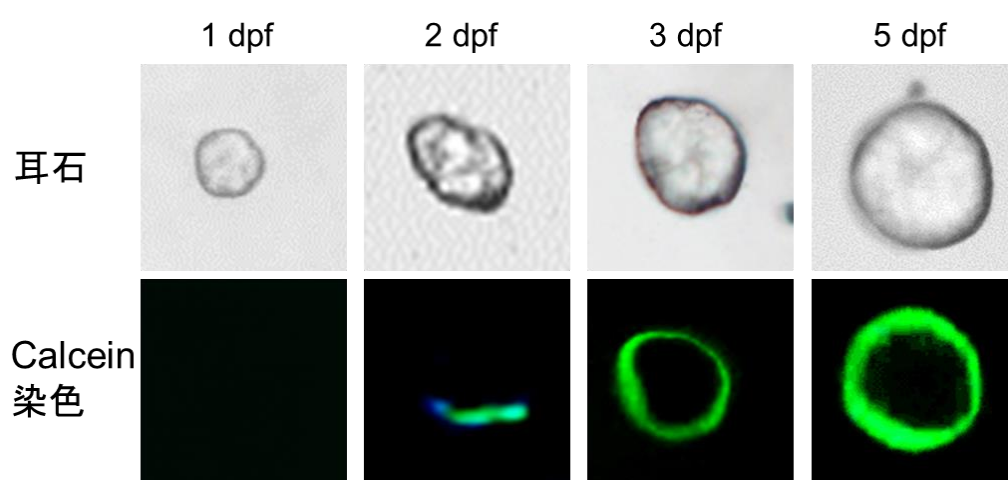
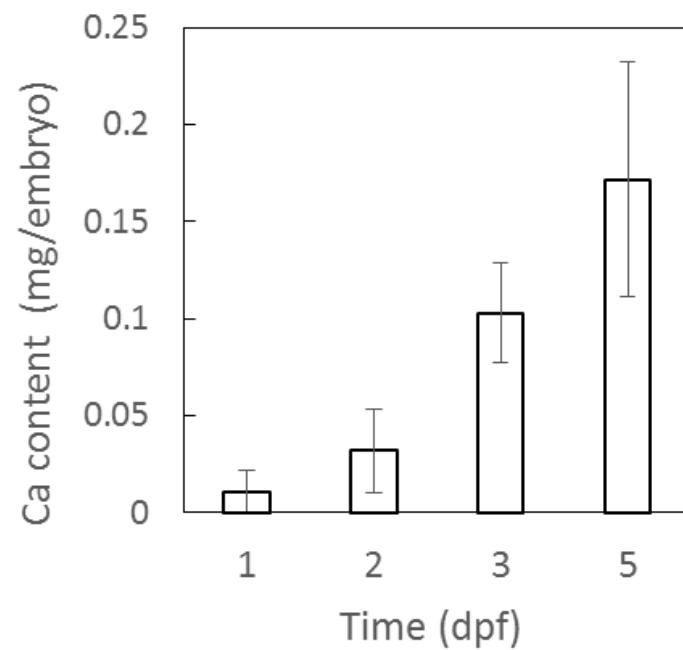


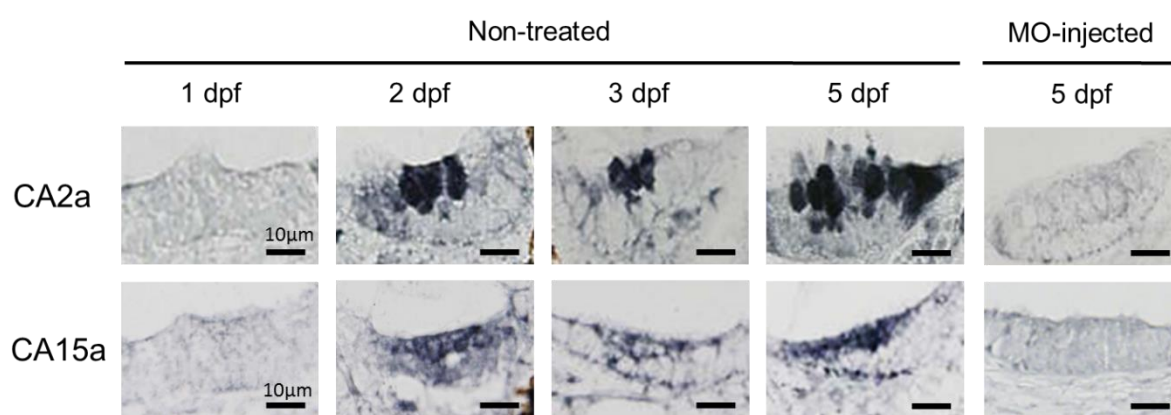
Fig. 5 ゼブラフィッシュ胚から単離した耳石と Calcein 染色

ゼブラフィッシュ胚(1, 2, 3, 5 dpf)を Calcein 染色した後、耳石を単離し蛍光顕微鏡にて観察した。耳石の石灰化部分は蛍光色を呈した。



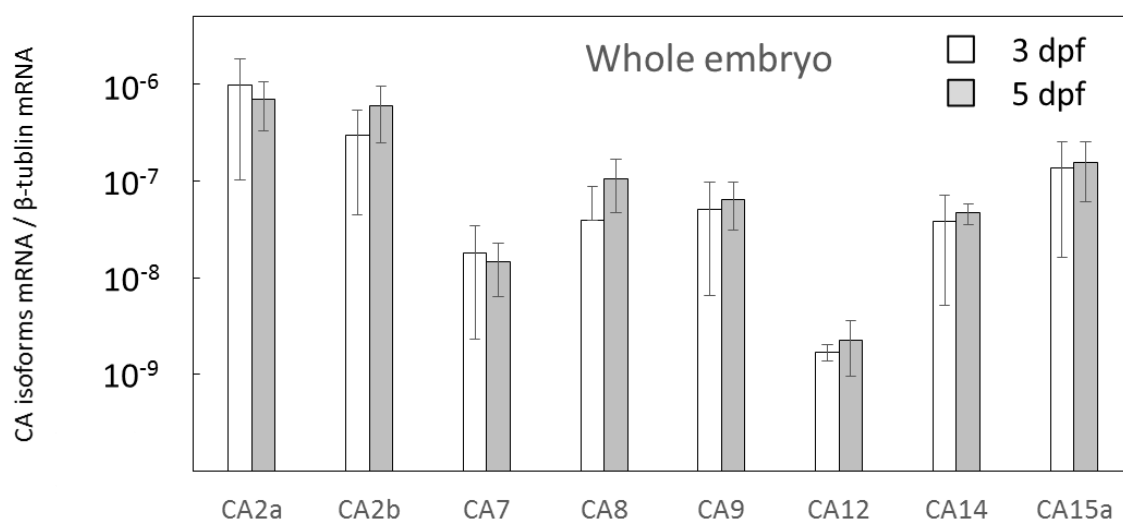
**Fig. 6 ゼブラフィッシュ胚発生過程における耳石中のカルシウム濃度**

ゼブラフィッシュ胚(1, 2, 3, 5 dpf)より耳石を単離し、EDTA 滴定法にて胚あたりの耳石中カルシウム量を測定した。(n=3, 平均値±標準偏差)



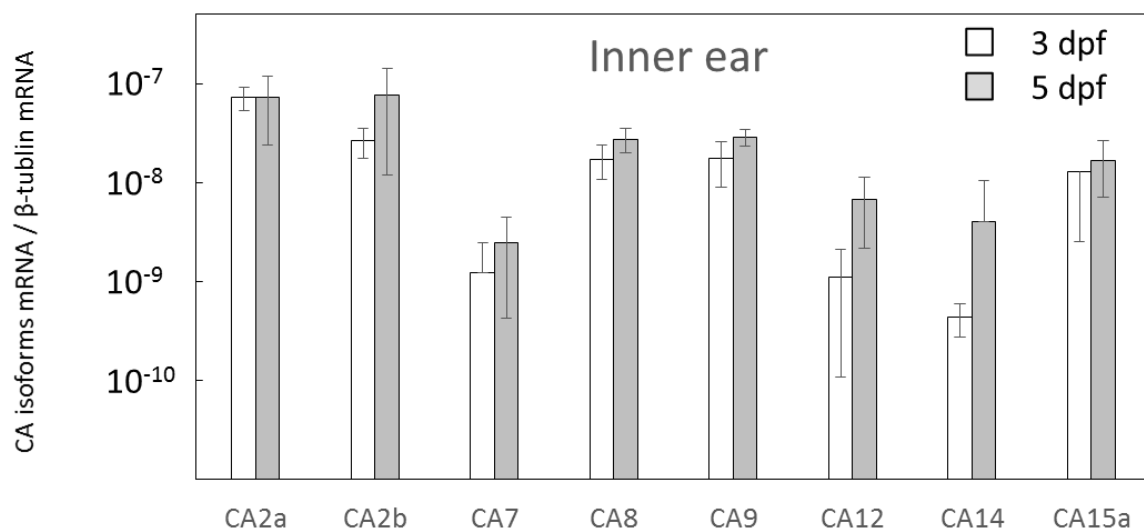
**Fig. 7 ゼブラフィッシュ胚発生過程における CA2a および CA15a の発現**

ゼブラフィッシュ胚(1, 2, 3, 5 dpf)を常法にてパラフィン切片を作製し免疫組織化学染色により CA2a もしくは CA15a 抗体にて染色した。Morpholino oligonucleotide をゼブラフィッシュ受精卵に注入し各遺伝子をノックダウンさせた標本(MO-injected)も同様に切片を作製し免疫組織化学染色を施した。bar=10  $\mu$ m。



**Fig. 8 ゼブラフィッシュ胚に発現する CA アイソフォーム mRNA 発現量**

3 dpf もしくは 5 dpf のゼブラフィッシュ胚から Total RNA を抽出した。cDNA を合成した後、Real time-PCR にて CA アイソフォームの定量を行った。内部標準には  $\beta$ -actin を用いた。n=3, 平均値  $\pm$  標準偏差。



**Fig. 9 ゼブラフィッシュ内耳に発現する CA アイソフォーム mRNA 発現量**

3 dpf もしくは 5 dpf のゼブラフィッシュから内耳を単離し Total RNA を抽出した。cDNA を合成した後、Real time-PCR にて CA アイソフォームの定量を行った。内部標準には  $\beta$ -actin を用いた。n=3, 平均値 ± 標準偏差。

### 第三章 炭酸脱水酵素阻害剤がゼブラフィッシュ胚発達に及ぼす影響

#### 背景

イオン輸送や pH 調節等の生体の恒常性維持に貢献している炭酸脱水酵素(CA)は、Cu や As 等の重金属、殺菌剤や殺虫剤等の農薬、てんかん薬や抗菌薬等の医薬品など複数の化合物により阻害されることが示されている(Dogan et al., 2006 ; Topal et al., 2014)。その作用機序は細胞や組織へのイオン供給阻害や酸塩基バランスの破たんにより細胞増殖抑制や細胞死誘導が生じると考えられているが(Mugiya, 1974; Ralston and Miyamoto, 1983; Mugiya and Takahashi, 1985; Miller and Scott, 1992)、魚類の聴覚、平衡覚の発達に対してどのような作用を示すか報告は殆どない。

本研究では、CA 阻害剤により生じた耳石形成や遊泳への影響およびそれに関わる CA 発現や局在解析、胚への化合物蓄積と酵素活性阻害について検討した。さらに胚発達期の聴覚や平衡覚の異常を明らかにするため、耳石が司る聴覚や平衡覚の感覚受容器である neuromast を構成する有毛細胞の損傷を組織学的、形態学的に捉え解析しゼブラフィッシュ胚で生じた内耳毒性の作用性を明らかとすることを目的とした。

## 方法

### 使用生物

(独)理化学研究所から分譲された 5～10 か月齢の雌雄のゼブラフィッシュ(RIKEN WT, *Danio rerio*) を用いた。

### 飼育条件

飼育には流水式水槽(名東水園)を用い、水温 28.5 °C、光条件(明 14 時間、暗 10 時間)に雌雄別に飼育し、1 日 4 回粉末飼料、うち 2 回は雌のみブラインシュリンプも給餌した。

### 被験物質

本試験に用いた化合物はエトキシゾルアミド(EZA, シグマアルドリッチ)、アセタゾルアミド(AZA, シグマアルドリッチ)、ドルゾラミド(DZA, 東京化成)を用いた。

### 受精卵採取

受精卵を採取する前日夕方に雌雄のゼブラフィッシュを交配させ、翌朝受精卵を得た。得られた受精卵はシャーレに移し 10%クロラミン T 含有 0.3×Danieau's solution [17.4 mM NaCl, 0.21 mM KCl, 0.12 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.18 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 1.5 mM HEPES pH 7.2; Gustafson et al., 2012]にて消毒した後、0.3×Danieau's solution で 3 回洗浄した。洗浄後 28°C で受精後 6 時間までインキュベートした。

### 化合物暴露

受精 6 時間後に実体顕微鏡下で正常発生している胚を 24well plate に移し (1 embryo/well)、DMSO に溶解した化合物を添加した。DMSO 濃度は 0.1%(v/v)となるよう添加した。対照群には 0.1%(v/v)となるよう DMSO を添加し、いずれも 5 日間 28°C でインキュベートした。

### 胚の形態観察

受精後 5 日に実体顕微鏡(M125, Leica)下で胚の生死、形態観察、遊泳行動の観察を行った。形態観察は、体節、頭部、尾部、脊索、耳部、眼、心臓、卵黄囊、血液循環に着目して観察した。



### 遊泳行動の評価

対照および化合物を受精後 6 時間から 5 日目まで暴露した稚魚を光照射下で遊泳行動量の評価を行った。行動量は 1 分間×3 回、実体顕微鏡(M125, Leica)に接続したカメラ(DP71, オリンパス光学工業)にて撮影し、解析には ImageJ software (version 1.49, National Institutes of Health)を用い、総移動距離を算出した。

### 成魚への化合物暴露

10～12 か月齢の雌雄のゼブラフィッシュ(RIKEN WT, *Danio rerio*) に 5 日間化合物を暴露し、生死、遊泳を評価した。

### CA 酵素活性の測定

対照および EZA を受精後 6 時間から 5 日目まで暴露した稚魚をホモジナイズし、サイトゾル分画を得た。Tohse らの方法に従い、酵素活性を測定した。

### 体表 pH の測定

対照および EZA を受精後 6 時間から 5 日目まで暴露した稚魚の体表 pH を pH メーターにて測定した。

### 走査型電子顕微鏡標本の作製

対照および EZA を受精後 6 時間から 5 日目まで暴露した稚魚をトリカイン過麻酔で安楽死させ、2.5%グルタルアルデヒドにて一晩固定した。50%-70%-90%-95%-99%-100%エタノールで段階的に脱水し、t-ブチルアルコールに置換させた後、凍結乾燥させた。凍結乾燥したサンプルをオスミウム酸で後固定し、走査型電子顕微鏡(JCM-5700, 日本電子)にて観察した。

### 耳石の Calsein 染色

対照および EZA を受精後 6 時間から 5 日目まで暴露した稚魚を 0.2% Calcein 水溶液にて 30 分間染色し、蒸留水で洗浄しトリカイン過麻酔で安楽死させ耳石を摘出した。摘出した耳石は蛍光顕微鏡(DM2500, Leica)にて観察した。

### 組織標本作成

対照および EZA を受精後 6 時間から 5 日目まで暴露した稚魚をトリカイン過麻酔で安楽死させ、10%中性ホルマリン緩衝液にて 1 週間程度固定させた。常法に従い、パラフィン切片(厚さ 3μm)を作製し、von Kossa 染色、HE 染色、TUNEL 染色を施し、光学顕微鏡にて観察した。

### 耳石中カルシウム濃度の測定

対照および EZA を受精後 6 時間から 5 日目まで暴露した稚魚をトリカイン過麻酔で安楽死させ、耳石を単離した。単離した耳石に 1N 塩酸を加え溶解させ、8N KOH にて pH12~13 に調整した。NN 指示薬(同仁化学)を数滴滴下後 EDTA にて滴定し、カルシウム濃度を求めた。

### アクリジンオレンジ／エチジウムブロマイド染色

対照および EZA を受精後 6 時間から 5 日目まで暴露した稚魚をアクリジンオレンジとエチジウムブロマイドを各  $5\mu\text{g/mL}$  含む 0.3×Danieau's solution で 20 分間インキュベートさせた。0.3×Danieau's solution で洗浄した後、トリカイン過麻酔で安楽死させ、蛍光顕微鏡にて観察した。

### 有毛細胞の染色

対照および EZA を受精後 6 時間から 5 日目まで暴露した稚魚に 3 種の染色試薬にて有毛細胞の染色を行った。DASPEI もしくは YO-PRO-1 (Thermo Foshier Scientific) は  $3\mu\text{M}$  を含む 0.3×Danieau's solution で 15 分間、FM1-43 (Thermo Foshier Scientific) は  $3\mu\text{M}$  を含む 0.3×Danieau's solution で 30 秒間インキュベートし染色した。各染色を施した後、トリカイン過麻酔で安楽死させ、蛍光顕微鏡にて観察した。Parvalbumin 抗体を用いた染色は、稚魚を 4%パラホルムアルデヒド含有 PBS にて 4℃で一晩固定させ、蒸留水で洗浄後 0.1%Triton および 0.5%ヤギ血清を含む PBS でブロッキングさせた。続いて、抗 Parvalbumin 抗体 (Merck Millipore, 1:500)を 1%ヤギ血清含有 PBS にて 4℃で一晩反応させた。PBS にて洗浄後、二次抗体 (Alexa Fluor 488, Life Technologies, 1:500)にて反応させ、蛍光顕微鏡下で観察した。

### 有毛細胞数の計測

DASPEI にて有毛細胞を染色したサンプルについて Neuromast 中の有毛細胞数を蛍光顕微鏡下で計測した。計測対象とした Neuromast は PO, SO1-3, O, OC, D1-2, M, IO1-3, OP, P1-2 とした。

### Real-time PCR 法による細胞死に関連する遺伝子の定量

対照および EZA を受精後 6 時間から 5 日目まで暴露した稚魚(約 40 匹分)から Nucleo spin Reagents(タカラバイオ)を用いて Total RNA を抽出した。抽出した RNA は濃度および純度を測定した後、Primescript RT reagent kit(タカラバイオ)にて cDNA を合成した。Real-time PCR にて細胞死に関連する遺伝子(Bcl-2, Bid, NF

$\kappa$  B p65, Caspase3, Caspase8, Caspase9, p53, p21, p27)の発現量を定量した。その際には  $\beta$ -actin を内部標準として用いた。

## 結果

### スルホンアミド系 CA 阻害剤によるゼブラフィッシュ胚、成魚に及ぼす影響

第 1 章で示した通り、スルホンアミド系 CA 阻害剤であるエトキシゾルアミド (EZA)、アセタゾルアミド (AZA)、ドルゾルアミド (DZA) をゼブラフィッシュ胚へ暴露したところ最も影響が強かったのは EZA であった。一般的に魚類への毒性影響は成魚に比べ、発達過程にある胚や稚魚は化学物質に対する感受性が高いと言われている (Nagel et al., 2002)。胚発達過程と成魚への影響を比較するため最も胚毒性が強い EZA と胚毒性が弱い AZA を成魚に暴露した。成魚への暴露期間は、胚への暴露と同じ 5 日間とし半数致死濃度 (LC<sub>50</sub>) と半数影響濃度 (EC<sub>50</sub>) を算出した (Table 1)。その結果、EZA の成魚に対する LC<sub>50</sub> は 10 ppm 以上であり、胚に対して 10 倍以上高かった。一方で AZA は胚と同様に 500 ppm でも死亡はみられなかった。遊泳への影響は EZA 10 ppm および AZA 500 ppm では方向感覚を失い上下方向への異常な遊泳を示した。その作用は成魚に比べ稚魚で強く、明らかな感受性差がみられた (Fig. 2)。胚の化合物暴露による遊泳行動への影響を定量的に計測するため、化合物を受精後 6 時間から 5 日目まで暴露した後、光照射下で 1 分間の行動量を測定した。0.63 ppm EZA 暴露した稚魚は、体勢を崩し横たわり、方向感覚を失い円を描くように遊泳した。行動量の低下は用量依存的にみられ、耳石低形成がみられた 0.31 ppm においても行動量の低下は有意であった。同様に AZA や DZA も濃度依存的に行動量が低下した。

EZA と AZA の胚毒性の感受性差の要因を調べるために化合物を受精後 6 時間から 5 日目まで暴露し化合物取り込み量とサイトゾル分画の CA 酵素活性を測定した (Fig. 3)。その結果、化合物取り込み量は EZA で暴露量の約 3.5 倍蓄積していたのに対し、AZA は暴露量に対し約 0.0092 倍しか存在しなかった。また CA 阻害活性の IC<sub>50</sub> は EZA が 0.11 ppm、AZA が 80 ppm であり、耳石形成や遊泳不良に対する影響濃度と差のない値であった。

### EZA によるゼブラフィッシュ耳石形成における石灰化の抑制

CA 阻害剤による耳石形成への影響が低濃度までみられたため最も影響の強かった EZA をゼブラフィッシュ初期胚に暴露し受精後 5 日目の組織にて標本作製し KOSSA 染色 (カルシウム染色) を施した。対照群の耳石では耳石全体が茶褐色に染色されカルシウムが検出されたのに対し、EZA を暴露した胚の耳石では耳石の外層に薄くカルシウムが沈着しているのが観察された。Calcein 染色においても外層に沈着したカルシウムにより蛍光が検出されたが、耳石中カルシウム量を定量したとこ

ろ、EZA 暴露により受精後 3 日では約 50%、受精後 5 日では約 40%まで低下していることが明らかとなった(Fig.4)。

### **EZA によるゼブラフィッシュ胚の pH 変動および細胞死の検出**

CA 阻害剤は細胞内の pH を上昇させ、その結果として細胞や組織、個体のホメオスタシスが破たんさせ、石灰化や骨化、器官・組織形成不全を引き起こすと言われている(Postel et al.,2012)。EZA を暴露したゼブラフィッシュ胚の体表 pH は EZA 暴露により濃度相関的に体表 pH が上昇していることが確認され(Fig. 5)、イオン輸送や pH 維持に影響を及ぼしている可能性が示唆された。内耳はイオン輸送体やそれに関わる酵素が多く存在しているため、内リンパ液の pH は変動を受けやすい。さらに、内リンパ液の pH 変動は耳石形成のみならず有毛細胞に対して影響が生じる可能性があることが報告されている (Stawiki et al., 2014) 。そこで EZA により有毛細胞へ傷害が起こっているかを確認するために HE 染色で組織学的変化を観察し、さらにアクリジンオレンジ/エチジウムブロマイド染色、TUNEL 染色を施しアポトーシスを検出した(Fig. 6)。EZA を暴露した胚の内耳上皮細胞は核および細胞質が濃縮し空胞化が生じ、アポトーシス様の変化がみられた。アクリジンオレンジ/エチジウムブロマイド染色では内耳に初期アポトーシスを示す緑色のシグナルが検出され、胸ビレにはオレンジ色の後期アポトーシスを示すシグナルが確認された。TUNEL 染色では内耳上皮細胞、特に支持細胞に TUNEL 陽性が検出された。

### **EZA による内耳有毛細胞傷害の解析およびアポトーシス関連遺伝子の関与**

EZA により異常のみられる内耳にアポトーシスが検出されたことから、有毛細胞への影響の有無を調べるため蛍光色素にて有毛細胞を染色し評価した(Fig. 7)。

Mitochondrial 色素である DASPEI 試薬にて Neuromast 中の有毛細胞を染色し、有毛細胞数を計測した。計測した Neuromast は PO, SO1-3, O, OC, D1-2, M, IO1-3, OP, P1-3 のうち、内耳にある Neuromast である O(Otic hair cells)のみ EZA により有毛細胞数が減少していることが示された。さらに mechanotransduction channels のマーカーである FM1-43FX や抗 parvalbumin 抗体における染色においても内耳の有毛細胞数が減少していることも明らかとなった。

このような内耳有毛の細胞死は、いくつかの耳毒性を誘発する化合物にて認められており、難聴等を引き起こすことが知られている(Coffin et al., 2013)。EZA においてはどのような機序で有毛細胞に影響を示すかアポトーシス関連遺伝子や細胞周期に関わる遺伝子群の発現変動を調べた(Fig. 8)。EZA を処理した胚では Bcl-2, p53, p21, p27 の発現量が対照群に対し増加していることが明らかとなった。EZA により DNA 損傷、細胞死、細胞周期を制御する中心的な役割を担う p53 およびその下流に

ある p21、p27 の発現誘導がみられ、一方ではアポトーシスを抑制する働きをもつ Bcl-2 の発現誘導もみられた。

## 考察

スルホンアミド系 CA 阻害剤はゼブラフィッシュ胚の発達過程において耳石低形成、遊泳異常を引き起こし、特に最も阻害作用の強い EZA は 0.08 ppm でもその影響がみられた。スルホンアミド系 CA 阻害剤のゼブラフィッシュ胚発達過程における影響差を比較したところ、耳石形成や遊泳行動に対する影響は EZA が AZA に比べ 350 倍程度強いという結果となった。スルホンアミド系 CA 阻害剤はスルホンアミド側鎖や脂溶性が薬効に大きく寄与するという報告がある (Mohammed, 2013)。スルホンアミド基の  $pK_a$  (pH 7.4) は AZA で 9.1、EZA で 8.0 と大きな差はないが、脂質分配係数はアセタゾルアミドの 0.001 に比べエトキシゾルアミドは 30 であり脂溶性が非常に高く、この特徴がゼブラフィッシュ胚に対する影響差にも大きく関与しているのではないかと考えられた。実際に、胚中への取り込みは、エトキシゾルアミドが暴露量の約 3.5 倍胚に蓄積していたのに対し、アセタゾルアミドは暴露量の 0.0092 倍しか蓄積していなかった。このようなことから AZA と EZA の物性差がゼブラフィッシュ胚発達に対する感受性差が生じた要因として考えられた。脂溶性の高い化合物は魚類の体内に蓄積しやすく、生物濃縮や生物蓄積性が高いという観点からも問題となる。特に稚魚や胚は組織や器官の発達が不十分で免疫や解毒機能が十分に発達していないため、化学物質への感受性が高いとのこれまでの見解を (Nagel, 2002; Russell et al., 1999; von Westernhagen, 1988, Braunbeck et al., 2005; Lammer et al., 2009; Seiler et al., 2014)、本研究結果は実証するデータとなった。

CA は内耳上皮細胞に局在し、内リンパ液への  $HCO_3^-$  供給に寄与する (Tohse et al., 2006)。CA 阻害剤を暴露した胚の耳石はカルシウム沈着が阻害され耳石中カルシウム濃度が有意に減少しており、聴覚や平衡覚への影響の要因であることが明らかとなった。CA 阻害剤による耳石形成阻害はニジマスやサーモン等の成魚でも生じることが知られているが、我々の結果からその感受性は胚発達期で著しく高いことが明らかとなった。その理由としては内耳上皮細胞に CA が時期特異的に高発現し、耳石へのカルシウム沈着が活発になるため、成魚とは異なり CA 阻害剤の感受性が高まっていることが考えられた。CA 阻害剤の作用としては上記に示したような耳石石灰化阻害への研究が中心になされてきたが、本研究では耳石石灰化に加えて、細胞内 pH 変化によるアポトーシス誘導、Neuromast を構成する有毛細胞損傷および聴覚神経系の損傷が生じることにも明らかにした。内耳上皮細胞では CA2a および 15a が発現する有毛細胞や支持細胞には核や細胞質の濃縮、空胞変性が生じアポトーシス様の組織変化が観察され、聴覚や平衡覚の消失がみられ、アポトーシス関連遺伝子発現変動が確認された。Neuromast や耳石石灰化への影響は内耳発達が活発化する受精後 2–5 日

に対する影響が顕著であり、孵化後外敵からの逃避，遊泳などを成魚する聴覚や平衡覚を消失させる可能性を示す結果となった。

以上の結果より胚発達期に高い毒性影響を示し、かつ多くの重金属や医薬品、農薬の阻害作用点である CA を阻害する EZA を選抜し毒性作用機序解明を試みた。

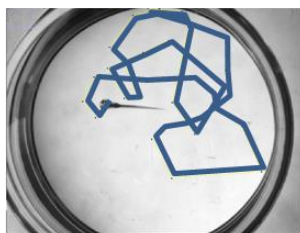
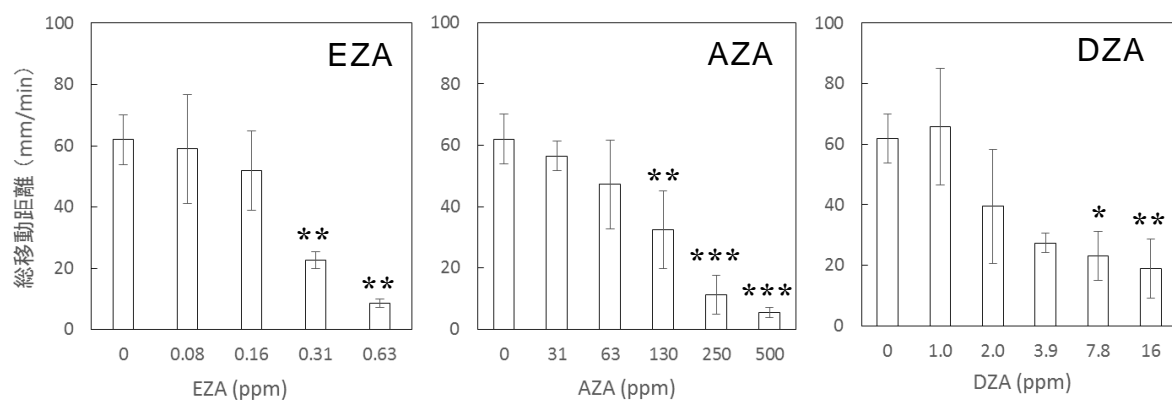
EZA は脂溶性が高く、体表からの化合物取り込み量が高いため、胚や稚魚のような未発達な個体に高い毒性を示すことを示した。さらに最も顕著な影響を示した内耳ではこれまで報告のない CA 阻害作用として、細胞内 pH 変化によるアポトーシス誘導、有毛細胞損傷および聴覚神経系の損傷等の新たな毒性を見出し毒性の作用機序を解明する手がかりを得ることができた。本研究より CA は胚発達過程において重要な役割を示す酵素であることを明らかとし、環境中に多く存在する CA 阻害作用を示す重金属、医薬品、農薬等の環境リスク評価においてはゼブラフィッシュ胚を用いた本試験系が簡易かつ高感度にリスク評価が可能であると考えられた。



化合物	稚魚		成魚	
	LC <sub>50</sub> (ppm)	EC <sub>50</sub> (ppm)	LC <sub>50</sub> (ppm)	EC <sub>50</sub> (ppm)
EZA	0.89	0.08	> 10	7.5
AZA	> 500	67.8	> 500	500

稚魚n=12, 成魚はn=10, いずれも5日間化合物を暴露した。

**Table 1 CA 阻害剤のゼブラフィッシュ稚魚および成魚に対する  
LC<sub>50</sub> および EC<sub>50</sub> の比較**



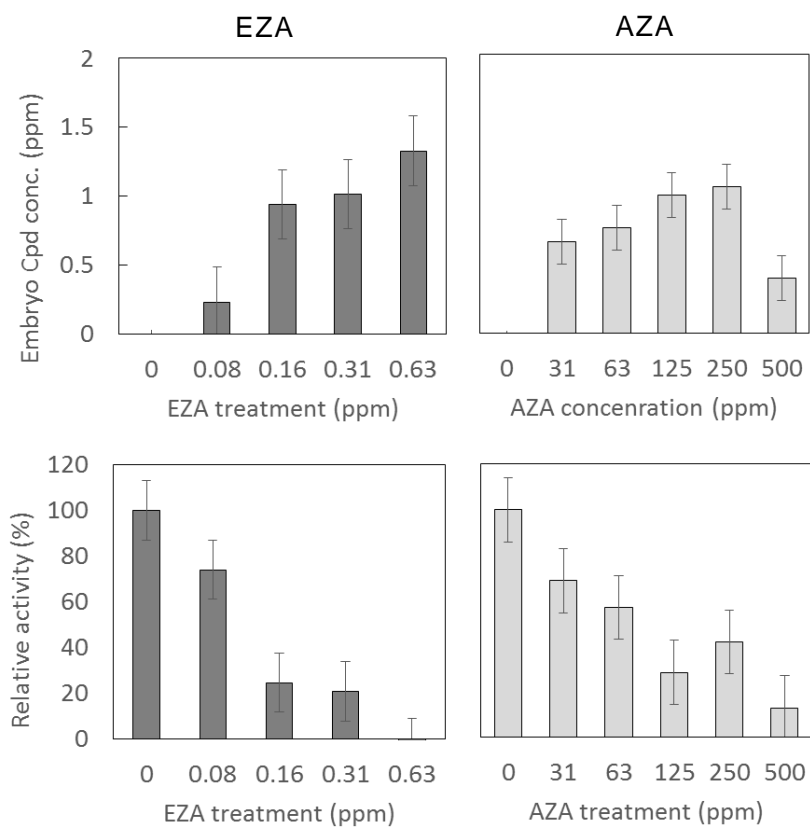
Control



EZA 0.63 ppm

**Fig. 2 スルホンアミド系 CA 阻害剤によるゼブラフィッシュの遊泳行動量**

CA 阻害剤を暴露したゼブラフィッシュ稚魚(5 dpf)を光照射下で 1 分間の総移動距離を測定した。\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$  (Dunnett test)



**Fig. 3 スルホンアミド系 CA 阻害剤による化合物取り込み量および酵素活性**

CA 阻害剤を暴露したゼブラフィッシュ稚魚(5 dpf)の化合物取り込み量を測定した。また稚魚から抽出したサイトゾル画分の CA 酵素活性を測定した。

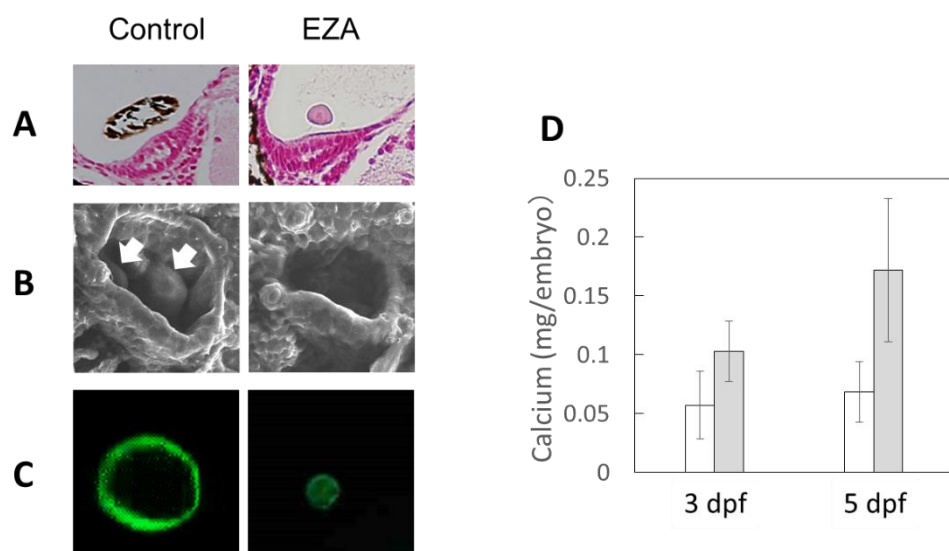
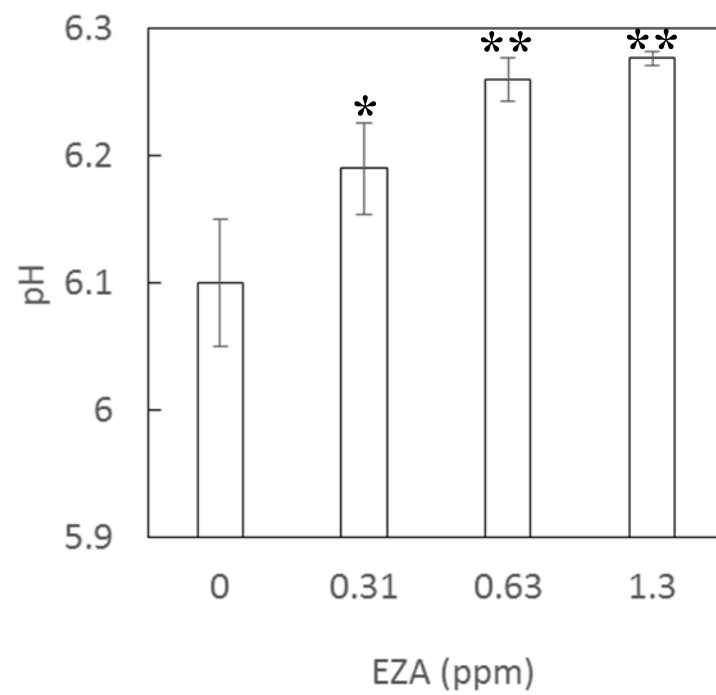


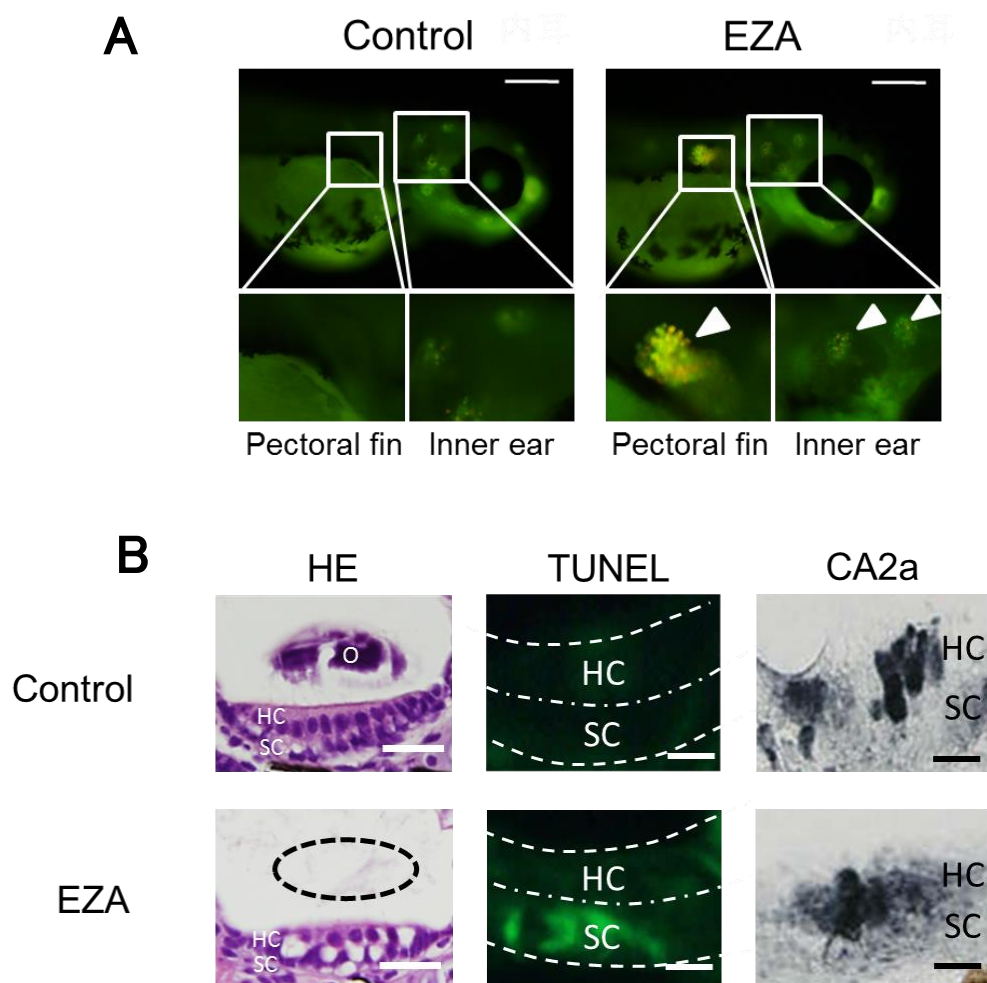
Fig. 4 EZA によるゼブラフィッシュ胚の耳石石灰化に対する影響

EZA 0.31ppm を暴露したゼブラフィッシュ(5dpf)の組織標本の KOSSA 染色 (A)、走査型電子顕微鏡像(B)および単離耳石のカルセイン染色(C)。EZA 0.31ppm を暴露したゼブラフィッシュ胚(3 および 5dpf)から単離した耳石中のカルシウム量を EDTA 滴定法にて定量した。



**Fig. 5 EZA によるゼブラフィッシュ胚の体表pH 変化**

EZA(0.31、0.63、1.3ppm )を暴露したゼブラフィッシュ(5dpf)の体表 pH を測定した。n=3, \*:p<0.05, \*\*:p<0.01 (Dunnet test)



**Fig. 6 EZA によるゼブラフィッシュ胚のアポトーシス誘導**

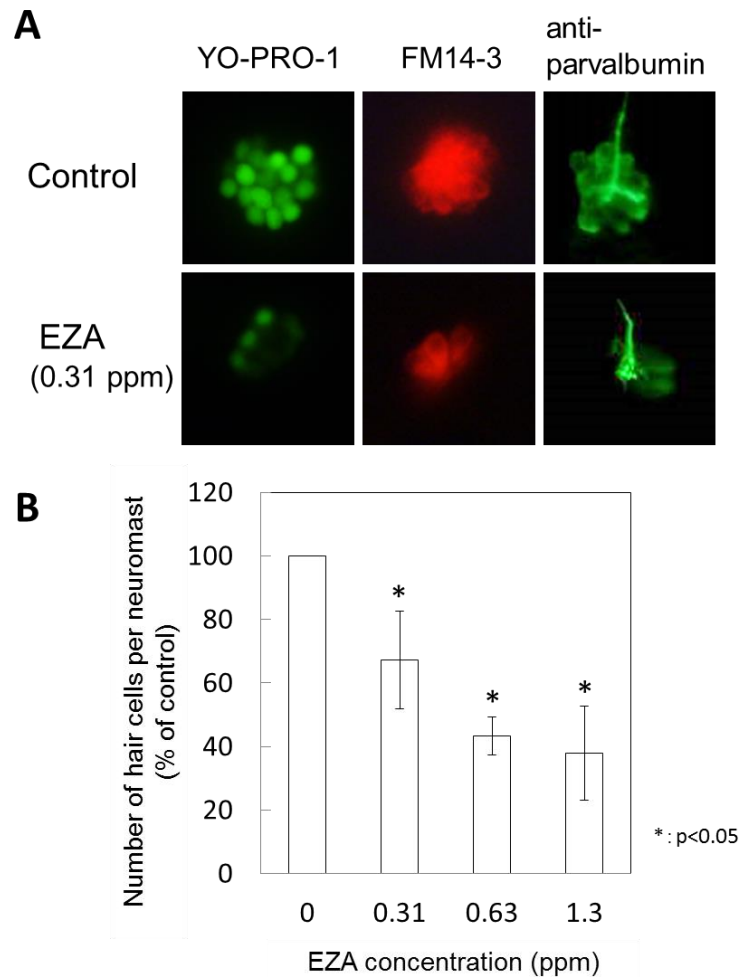
(A) EZA 0.31ppm を暴露したゼブラフィッシュ(5dpf)をアクリジンオレンジとエチジウムブロマイドで染色し、アポトーシスを検出した。胸びれには後期アポトーシスを示すオレンジ色、内耳には初期アポトーシスを示す緑色が核にされた。bar=200  $\mu$ m。

(B) EZA 0.31ppm を暴露したゼブラフィッシュ(5dpf)の内耳組織切片を作成し、HE 染色、TUNEL 染色、CA2a 抗体染色を施した。bar=10  $\mu$ m。O: 耳石、HC: 有毛細胞、SC: 支持細胞

Table 6 EZA によるゼブラフィッシュ胚の有毛細胞に及ぼす影響

EZA (ppm)	有毛細胞数														
	PO	SO1	SO2	SO3	O	OC	D1	D2	M	IO1	IO2	IO3	OP	P1	P3
0	8.7	9.7	10.0	10.0	14.3	12.7	11.7	11.7	8.7	12.7	10.7	10.3	11.3	11.0	11.7
0.08	8.3	10.0	11.0	10.7	12.7	12.0	10.7	11.7	9.0	10.0	10.3	9.7	11.7	11.3	10.0
0.16	9.3	10.3	10.7	10.7	12.0	11.7	11.7	10.7	9.0	11.0	10.7	11.0	11.3	10.7	11.0
0.31	8.0	9.3	10.7	11.7	6.7*	11.3	11.3	12.0	8.7	10.0	10.7	11.0	11.7	10.7	11.3

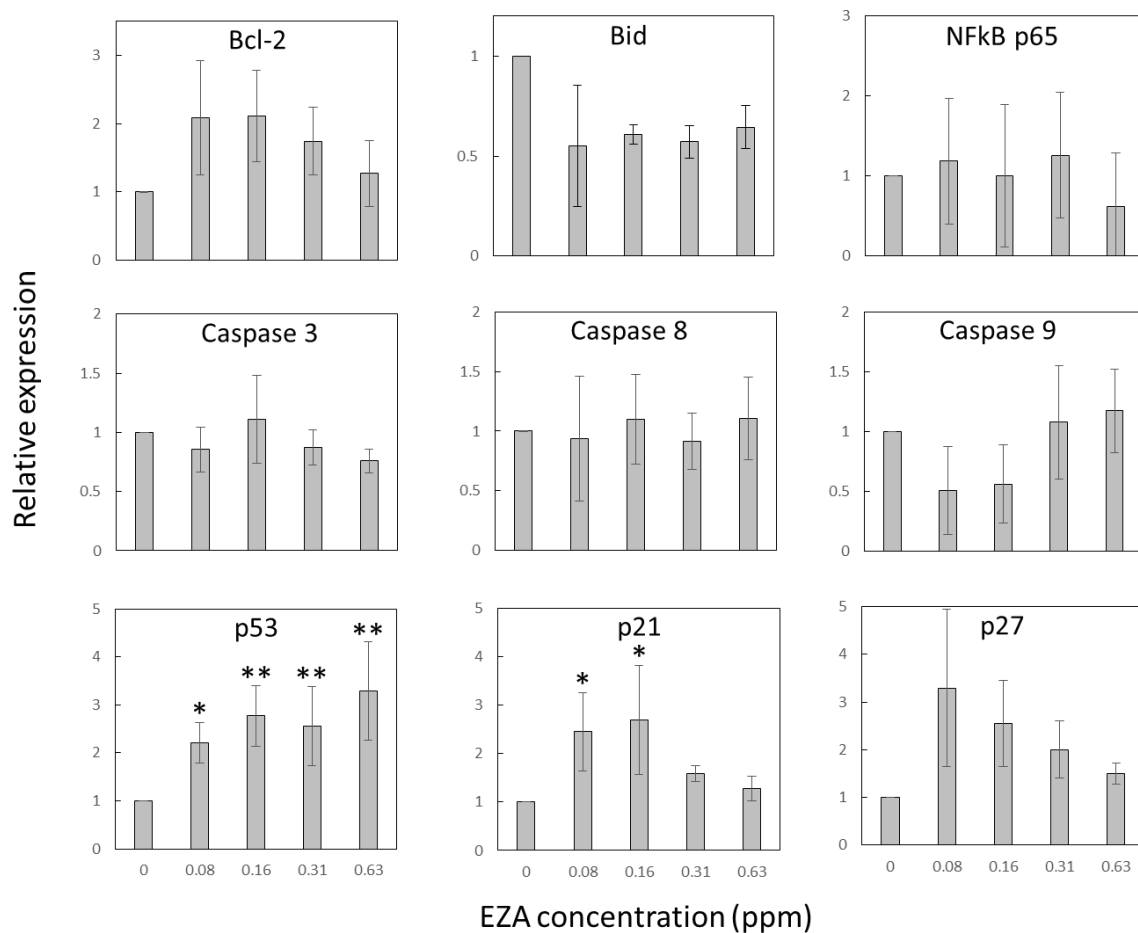
有毛細胞数はDASPEIにて蛍光標識した有毛細胞を計測しNeuromastあたりの数で算出した。  
n=3, \*:P <0.05 (Dunnet's test).



**Fig. 7 EZA によるゼブラフィッシュ胚の内耳有毛細胞に対する影響**

EZA 0.31ppm を暴露したゼブラフィッシュ(5dpf)の内耳有毛細胞の検出。EZA(0.31、0.63、1.3ppm )を暴露したゼブラフィッシュ(5dpf)の内耳有毛細胞数を測定した。n=3, \*:p<0.05, \*\*:p<0.01 (Dunnet test)





**Fig. 8 EZA がゼブラフィッシュ胚のアポトーシス関連遺伝子  
および細胞周期に関わる遺伝子群の発現に及ぼす影響**

EZA 0.31ppm を暴露したゼブラフィッシュ(5dpf)胚から Total RNA を抽出した。cDNA を合成した後、Real time-PCR にてアポトーシスおよび細胞周期に関わる遺伝子群の発現を調べた。内部標準には  $\beta$ -actin を用いた。n=3, 平均値±標準偏差。\*:p<0.05, \*\*:p<0.01 (Dunnett test)

## 引用文献

- Amsterdam A, Nissen RM, Sun Z, Swindell EC, Farrington S, Hopkins N (2004) Identification of 315 genes essential for early zebrafish development. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:12792–12797
- Aspatwar A, Tolvanen MEE, Jokitalo E, Parikka M, Ortutay C, Harjula SKE, Rämetsä M, Vihinen M, Parkkila S (2013) Abnormal cerebellar development and ataxia in carp VIII morphant zebrafish. *Hum Mol Genet* 22:417–432
- Beier M, Anken R (2006) On the role of carbonic anhydrase in the early phase of fish otolith mineralization. *Adv Space Res* 38:1119–1122
- Beier M, Hilbig R, Anken R (2008) Histochemical localisation of carbonic anhydrase in the inner ear of developing cichlid fish, *Oreochromis mossambicus*. *Adv Space Res* 42: 1986–1994
- Bian C, Zhao Y, Guo Q, Xiong Y, Cai W, Zhang J (2014) Aromatase inhibitor letrozole downregulates steroid receptor coactivator-1 in specific brain regions that primarily related to memory, neuroendocrine and integration. *J Steroid Biochem Mol Biol* 141:37–43
- Brubaker KD, Mao F, Gay CV (1999) Localization of carbonic anhydrase in living osteoclasts with bodipy 558/568–modified acetazolamide, a thiadiazole carbonic anhydrase inhibitor. *J Histochem Cytochem* 47:545–550.
- Braunbeck T, Böttcher M, Hollert H, Kosmehl T, Lammer E, Leist E, Rudolf M, Seitz N (2005) Towards an alternative for the acute fish LC<sub>50</sub> test in chemical assessment: the fish embryo toxicity test goes multi–species – an update. *ALTEX* 22:87–102
- Coffin AB, Williamson KL, Mamiya A, Raible DW, Rubel EW (2013) Profiling drug–induced cell death pathways in the zebrafish lateral line. *Apoptosis* 18:393–408
- Cooke AS (1973) Shell thinning in avian eggs by environmental pollutants.

Doğan S (2006) The in vitro effects of some pesticides on carbonic anhydrase activity of *Oncorhynchus mykiss* and *Cyprinus carpio carpio* fish. J Hazard Mater 132:171–176

Dukes M, Edwards PN, Large M, Smith IK, Boyle T (1996) The preclinical pharmacology of "Arimidex" (anastrozole; ZD1033) a potent, selective aromatase inhibitor. J Steroid Biochem Mol Biol 58: 439-45

Eastin WC Jr, Spaziani E (1978) On the mechanism of calcium secretions in the avian shell gland (uterus). Biol Reprod 19:505-518.

Fushimi S, Wada N, Nohno T, Tomita M, Saijoh K, Sunami S, Katsuyama H (2009) 17beta-Estradiol inhibits chondrogenesis in the skull development of zebrafish embryos. Aquat Toxicol 95:292-298

Gorelick DA, Watson W, Halpern ME (2008) Androgen receptor gene expression in the developing and adult zebrafish brain. Dev Dyn. 237 :2987-95

Gustafson AL, Stedman DB, Ball J, Hillegass JM, Flood A, Zhang CX, Panzica-Kelly J, Cao J, Coburn A, Enright BP, Tornesi MB, Hetheridge M, Augustine-Rauch KA (2012) Inter-laboratory assessment of a harmonized zebrafish developmental toxicology assay –progress report on phase I. Reprod Toxicol 33:155 – 164

He Y, Yu H, Sun S, Wang Y, Liu L, Chen Z, Li H (2013) Trans – 2 – phenylcyclopropylamine regulates zebrafish lateral line neuromast development mediated by depression of LSD1 activity. Int J Biol 57:363 – 373

Hsu CJ (1991) Ultrastructural study of cytochemical localization of carbonic anhydrase in the inner ear. Acta OtoLaryngol 111:75–84.

Ito Y, Kobayashi S, Nakamura N, Miyagi H, Esaki M, Hoshijima K, Hirose S (2013) Close association of carbonic anhydrase (CA2a and CA15a), Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger (Nhe3b), and ammonia transporter Rhcg1 in zebrafish ionocytes responsible for Na<sup>+</sup> uptake. *Front Phys* 4:1–17

Inoue M, Tanimoto M, Yoichi O (2013) The role of ear stone size in hair cell acoustic sensory transduction. *Sci Rep* 3:2114

Komoike Y, Matsuoka M (2016) Application of Zebrafish Model to Environmental Toxicology. *Nihon Eiseigaku Zasshi* 71:227–235

Komori K, Suzuki Y (2009) Occurrence of pharmaceuticals and their environmental risk assessment of urban streams whose basins have different wastewater treatment conditions. *Journal of Japan society on water environment* 32:133–138

Lammer E, Carr GJ, Wendler K, Rawlings JM, Belanger SE, Braunbeck T (2009) Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comp Biochem Phys C* 149:196–209

Levine AJ, Oren M (2009) The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer* 9:749–758

Liao BK, Chen RD, Hwang PP (2009) Expression regulation of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase alpha1-subunit subtypes in zebrafish gill ionocytes. *Am J Physiol* 296:R1897–R1906

Lin TY, Liao B, Horng J, Yan J, Hsiao C, Hwang P (2008) Carbonic anhydrase 2-like a and 15a are involved in acid-base regulation and Na<sup>+</sup> uptake in zebrafish H<sup>+</sup>-ATPase-rich cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 294:C1250–1260

Liu Z, Zuo J (2008) Cell cycle regulation in hair cell development and regeneration in the mouse cochlea. *Cell Cycle* 7:2129–2133

Lowenheim H, Furness DN, Kil J, Zinn C, Gultig K, Fero ML (1999) Gene

disruption of p27 (Kip1) allows cell proliferation in the postnatal and adult organ of corti. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:4084–4088

Mantela J, Jiang Z, Ylikoski J, Fritzsche B, Zacksenhaus E, Pirvola U (2005) The retinoblastoma gene pathway regulates the postmitotic state of hair cells of the mouse inner ear. *Development* 132:2377–2388

Maren TH (1992) Direct measurements of the rate constants of sulfonamides with carbonic anhydrase. *Mol Pharmacol* 41:419–426

Maren TH, Conroy CW (1993) A new class of carbonic anhydrase inhibitor. *J Biol Chem* 268:26233–26239

Mayer-Gostan N, Kossmann H, Watrin A, Payan P, Boeuf G (1997) Distribution of ionocytes in the saccular epithelium of the inner ear of two teleosts (*Oncorhynchus mykiss* and *Scophthalmus maximus*). *Cell Tissue Res* 289:53–61

Miller DS, Kinter WB, Peakall DB (1976) Enzymatic basis for DDE-induced eggshell thinning in a sensitive bird. *Nature* 259:122–124

Miyachi S, Tsuzuki M, Avramova ST (1983) Utilization modes of inorganic carbon for photosynthesis in various species of Chlorera. *Plant Cell Physiol* 24:441–51

Mohammed A Why are early life stages of aquatic organisms more sensitive to toxicants than adults? New insights into toxicology and drug testing. *Chaper3*:39–62

Mugiya Y (1977) Effect of acetazolamide on the otolith growth of goldfish. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 43:1053–1058

Mugiya Y, Takahashi K (1985) Chemical properties of the saccular endolymph in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Bull Fac Fish Hokkaido Univ* 36:57–60

Murayama E, Takagi Y, Ohira T, Davis JG, Greene MI, Nagasawa H (2002) fish otolith contains a unique structural protein, otolin-1. *Eur J Biochem* 269:688–696

Nagel R (2002) DarT: the embryo test with the Zebrafish *Danio rerio*—A general model in ecotoxicology and toxicology. *Altex* 19:38–48

Nau H, Hauck RS, Ehlers K (1991) Valproic acid-induced neural tube defects in mouse and human: aspects of chirality, alternative drug development, pharmacokinetics and possible mechanisms. *Pharmacol Toxicol* 69:310–321

Okamura HO, Sugai N, Suzuki K, Ohtani I (1996) Enzyme-histochemical localization of carbonic anhydrase in the inner ear of the guinea pig and several improvements of the technique. *Histochem Cell Biol* 106:425–430

Pietsch EC, Sykes SM, McMahon SB, Murphy ME (2008) The p53 family and programmed cell death. *Oncogene* 27:6507–6521

Pocker Y, Beug WM, Ainardi VR (1971) Carbonic anhydrase interaction with DDT, DDE and dieldrin. *Science*, 174:1336–1339

Radtko R, Dean J (1982) Increment formation in the otoliths of embryos, larvae and juveniles of the mummichog, *Fundulus heteroclitus*. *Fish Bull US* 80:201–215

Ralston S, Miyamoto GT (1983) Analyzing the width of daily otolith increments to age the Hawaiian snapper, *pristipomoides filamentosus*. *Fishery Bulletin* 81:523–535

Russell RW, Gobas FAPC, Haffner GD (1999) Maternal transfer and in ovo exposure of organochlorines in oviparous organisms: A model and field verification. *Environ Sci Technol* 33:416–420

Scott WJ, Duggan CA, Schreiner CM, Collins MD (1990) Reduction of embryonic intracellular pH: a potential mechanism of acetazolamide-induced limb malformations. *Toxicol Appl Pharmacol* 103: 238–254

Seiler C, Nicolson T (1999) Defective calmodulin-dependent rapid apical endocytosis in zebrafish sensory hair cell mutants. *J Neurobiol* 41:424–434

- Seiler TB, Best N, Fernqvist MM, Hercht H, Smith KEC, Braunbeck T, Mayer P, Hollert H (2014) PAH toxicity at aqueous solubility in the fish embryo test with *Danio rerio* using passive dosing. *Chemosphere* 112:77–84
- Shiao JC, Lin LY, Horng JL, Hwang PP, Kaneko T (2005) How can teleostean inner ear hair cells maintain the proper association with the accreting otolith? *J Comp Neurol* 488: 331–341
- Shinohara C, Yamashita K, Matsuo T, Kitamura S, Kawano F (2007) Effects of Carbonic Anhydrase Inhibitor Acetazolamide (AZ) on Osteoclasts and Bone Structure. *Journal of hard tissue biology* 16:115–123
- Stawicki TM, Owens KN, Linbo T, Reinhart KE, Rubel EW, Raible1 DW (2014) The zebrafish merovingian mutant reveals a role for pH regulation in hair cell toxicity and function. *Dis Model Mech* 7:847–856
- Tohse H, Ando H, Mugiya Y (2004) Biochemical properties and immunohistochemical localization of carbonic anhydrase in the sacculus of the inner ear in the salmon *Oncorhynchus masou*. *Comp Biochem Physiol A* 137:87–94
- Tohse H, Murayama E, Ohira T, Takagi Y, Nagasawa H (2006) Localization and diurnal variations of carbonic anhydrase mRNA expression in the inner ear of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Comp Biochem Physiol B* 145:257–264
- Topal A, Atamanalp M, Oruc E, Demir Y, Beydemir S, Isık A (2014) *In vivo* changes in carbonic anhydrase activity and histopathology of gill and liver tissues after acute exposure to chlorpyrifos in rainbow trout. *Arh Hig Rada Toksikol* 65:377–385
- Tsuzuki M, Miyachi S (1989) The Function of Carbonic anhydrase in aquatic photosynthesis. *Aquat Bot* 34: 85–104
- Tytler P, Bell MV (1989) A study of diffusional permeability of water, sodium and chloride in yolk-sac larvae of cod (*Gadus morhua* L). *J exp Biol* 147:125–132

van Gelder MM, van Rooij IA, Miller RK, Zielhuis GA, de Jong-van den Berg LT, Roeleveld N (2010) Teratogenic mechanisms of medical drugs. *Hum Reprod Update* 16 :378-94

von Westernhagen H (1988) Sublethal effects of pollutants on fish eggs and larvae. *Fish physiology series 11. The physiology of developing fish Part A Eggs and Larvae* San Diego: Academic Press 253–346.

Wang T, Wang J, Qiu J (1996) Observation on activity of carbonic anhydrase in the vestibule of guinea pigs. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi* 31:24–25

Wu L, Sagong B, Choi JY, Kim UK, Bok J (2013) A systematic survey of carbonic anhydrase mRNA expression during mammalian inner ear development. *Dev Dyn* 242:269–280



## 謝辞

本研究を進めるに当たり、指導教官としてご指導いただきました都筑教授、指導教員である藤原先生には深く感謝申し上げます。共同研究をさせていただきました 東京工業大学 理工学院 中村先生、宮城さんには感謝申し上げます。

最後に研究生生活を送るにあたり、支えていただいた家族と職場の皆さまに感謝申し上げます。